

⑨ 日本国特許庁 (JP)
 ⑩ 公表特許公報 (A)

⑪ 特許出願公表

平4-505763

⑫ 公表 平成4年(1992)10月8日

⑬ Int.CI¹
 C 07 K 1/04
 17/08
 G 01 N 23/58

級別記号
 D

序内整理番号
 8918-4H
 7731-4H
 8810-2J*

審査請求有
 予備審査請求有

部門(区分) 3 (2)

(全 25 頁)

⑭ 明の名称 非常に大規模な固定化ペプチド合成

⑮ 特 願 平2-508966
 ⑯ 出 願 平2(1990)6月7日

⑰ 説明文提出日 平3(1991)12月7日

⑱ 国際出願 PCT/NL90/00081

⑲ 國際公開番号 WO90/15070

⑳ 國際公開日 平2(1990)12月13日

優先権主張 ① 1989年6月7日 @米国(US)② 962,901

④ 発明者 バイアリング、マイケル シー。 アメリカ合衆国、ノース キャロライナ 27707, ダーラム, コットンウッド 3421

⑤ 出願人 アフィマックス テクノロジーズ オランダ領アンテイル, キュラコ, デ リュイデルカデ 62

ナームロゼ ベノートスハップ

⑥ 代理人 代理 人 告木 朗 外4名

⑦ 指定国 AT, AT(広域特許), AU, BB, BE(広域特許), BF(広域特許), BG, BJ(広域特許), BR, CA, CF(広域特許), CG(広域特許), CH, CH(広域特許), CM(広域特許), DE, DE(広域特許), DK, DK(広域特許), ES, ES(広域特許), FI, FR(広域特許), GA(広域特許), GB, CB(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KP, KR, LK, LU, LU(広域特許), MC, MG, ML(広域特許), MR(広域特許), MW, NL, NL(広域特許), NO, RO, SD, SE, SE(広域特許), SU, TD(広域特許), TG(広域特許)

最終頁に統く

請求の範囲

1. 基体上で配列を組立する方法であつて、
 - a) 前記基体の第一領域をアクチベーターに暴露することにより保護基を除去する；
 - b) 少なくとも前記第一領域を第一モノマーに暴露する；
 - c) 第二領域をアクチベーターに暴露することにより保護基を除去する；及び
 - d) 少なくとも前記第二領域を第二モノマーに暴露する；
2. アクチベーターに暴露する前記段階が、イオンビーム、電子ビーム、UV-線、X-線、紫外線放射、光、赤外線放射、マイクロウェーブ、電波、ラジオ波、及びこれらの組合せから成る群から選択されたアクチベーターを使用する、請求項1に記載の方法。
3. 前記保護基が感光性保護基である、請求項1に記載の方法。
4. アクチベーターに暴露する前記段階が前記基体の選択された領域に光を適用する段階である、請求項1に記載の方法。
5. 前記第一モノマー及び第二モノマーがアミノ酸である、請求項1に記載の方法。
6. 前記基体上の配列を受容体との親和性についてスクリーニングする段階をさらに含み、このスクリーニング段階が前記基体を前記受容体に暴露しそして前記第一領域及び第二

領域中の英記受容体の存在について試験する段階をさらに含んで成る、請求項1に記載の方法。

7. 前記受容体が抗体である、請求項6に記載の方法。
 8. 前記基体が、複合したラングミア・プロジェクト(Shanghailei Wang et al.) フィルム、官能化されたガラス、ゲルマニウム、シリコン、ポリマー、(ポリ)テトラフルオロエチレン、ポリстиレン、塗化ガリウム、及びこれらの組合せから成る群から選択されたものである、請求項1に記載の方法。

9. 前記保護基がオルト-ニトロベンジル誘導体、6-ニトロベラトリルオキシカルボニル、2-ニトロベンジルオキシカルボニル、シントモイル誘導体、及びこれらの混合物から成る群から選択されたものである、請求項1に記載の方法。

10. 前記第一領域及び第二領域の各々が約1m²と10,000pm²との間の全面積を有する、請求項1に記載の方法。

11. 前記第一領域及び第二領域の各々が約1m²と10,000pm²との間の全面積を有する、請求項1に記載の方法。

12. 前記光が単色干涉性光である、請求項6に記載の方法。

13. アクチベーターに暴露する前記段階が前記基体に接触した溶媒と共に行われる、請求項1に記載の方法。

14. 前記溶媒がさらに前記第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る、請求項1-3に記載の方法。

15. 前記受容体が更に放射性標識及び蛍光標識から成る群から選択された標識を含んで成り、そして受容体の存在を

特表平4-505763(2)

前記基体保護基を活性化する：

6) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマーは更に第二モノマー保護基を含んで成り、該第二モノマーは前記第二領域において結合する：

7) 前記第一領域を活性化することにより前記第一モノマー保護基を除去する：

8) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第一領域において結合して由一配列を生成する：

9) 前記第二領域を活性化することにより前記第二モノマー保護基を除去する；並びに

10) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第二領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

脱離を含んでなる方法。

20. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域（該第一領域及び第二領域は基体保護基を含んで成る）を有する基体上の第一領域において、該第一領域を活性化することにより該第一領域中の前記基体保護基を除去する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは更に第一モノマー保護基を含んで成り、該第一モノマーは前記第一領域において結合する；

c) 前記第二領域を活性化することにより該第二領域中の前記基体保護基を除去する；

d) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

e) 前記第二モノマーを前記基体に暴露し、該第二モノマー

6) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記基体に向け、該エネルギーが前記第二ポリマーの第一部から前記第二マスクの前記第一部以下の前記保護基を除去する；並びに

7) 前記第二ポリマーの第二部分を前記基体に暴露し、該第二ポリマーの該第二部分が該第二ポリマーの前記第一部と結合して第二ポリマー配列を生成せしめる；

脱離を含んで成る方法。

22. 受容体との結合について複数のアミノ酸配列をスクリーニングする方法であって、

8) 少なくとも第一表面（該少なくとも第一表面はニトロペラトリルオキシカルボニル及びニトロベンジルオキシカルボニルから成る群から選択された先保護材料を含んで成る）を有するガラス板上で、前記少なくとも第一表面を若屈のために：一ブトキシカルボニルと反応せしめ、前記ガラス板は少なくとも紫外光に対して実質的に透過性である；

9) 前記少なくとも第一表面を下下に暴露することにより前記一ブトキシカルボニルを除去する；

10) 前記ガラス板を反応器上に置き、該反応器は反応空間を含んで成り、前記少なくとも第一表面が該反応空間に暴露される；

11) 前記ガラス板上の第一位置にマスクを置き、該マスクは第一場所及び第二場所を含んで成り、該第一場所は少なくとも紫外光に対しても実質的に透過性でありそして該第二場所は少なくとも紫外光に対して実質的に不透過性であり、該第二場所は前記マスクの第一表面上の光遮断材料を含んで成り、

該被する前記段階が前記段階を被する段階である、請求項にも記載の方法。

16. アクティベーターに暴露する前記段階が、

a) ある彼長の元に対して實質的に透過性の領域及び實質的に不透過性の領域を有するマスクを前記基体に隣接して置く；並びに

b) 少なくとも前記彼長の光を生成する光譜により前記マスクを闇切する；

成功を更に含んで成る、請求項1に記載の方法。

17. 前記基体上で10°又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が復復される、請求項1に記載の方法。

18. 前記基体上で10°又はこれより多くの異なる配列を合成するように前記段階が反復される、請求項1に記載の方法。

19. 少なくとも第一モノマー及び第二モノマーを含んで成る複数の化学配列を合成する方法であって、

a) 少なくとも第一領域及び第二領域（該第一領域及び第二領域は基体保護基を含んで成る）を有する基体上の第一領域において、該第一領域を活性化することにより該第一領域中の前記基体保護基を除去する；

b) 前記第一モノマーを前記基体に暴露し、該第一モノマーは更に第一モノマー保護基を含んで成り、該第一モノマーは前記第一領域において結合する；

c) 前記第二領域を活性化することにより該第二領域中の

1-前記第一領域において結合する；

1) 前記第二領域中の前記保護基を除去する；

2) 前記第一領域を不活性化することにより該第一領域中に保護基を提供する；

3) 第三モノマーを前記基体に暴露し、該第三モノマーは前記第二領域において結合して第一配列を生成する；

4) 前記第一領域中の前記保護基を除去する；

5) 第四モノマーを前記基体に暴露し、該第四モノマーは前記第一領域において結合して第二配列を生成し、該第二配列は前記第一配列と異なる；

成層を含んで成る方法。

21. 基体上で少なくとも第一ポリマー配列及び第二ポリマー配列を合成する方法であって、該第一ポリマー配列は該第二ポリマー配列とは異なるモノマー配列を有し、

a) 前記基体とエネルギー源との間に第一マスクを挿入し、該マスクは第一領域及び第二領域を有し、該第一領域は前記エネルギー源からのエネルギーの通過を許し、該第二領域は前記エネルギー源からのエネルギーを遮断する；

b) 前記エネルギー源からのエネルギーを前記第一領域下の前記第一ポリマーの第一部から保護基を除去する；

c) 前記第一ポリマーの第二領域を前記基体に暴露することにより第一ポリマー配列を生成せしめる；

d) 前記基体と前記エネルギー源との間に第二マスクを挿入し、該第二マスクは第一領域及び第二領域を有する；

特表平4-505763(3)

該マスクの該第一表面は前記ガラス板と接触する：

a) 前記反応空間を反応培養で充たす；

i) 前記マスクを少なくとも紫外外により照らし、該紫外光が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

j) 前記第一表面を第一アミノ酸に曝露し、該第一アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第一アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

k) マスクを前記ガラス板と第二位置において接触せしめる；

l) 前記マスクを少なくとも紫外外により照らし、該紫外光が前記マスクの第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

m) 前記少なくとも第一表面を第二アミノ酸に曝露し、該第二アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第二アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

n) マスクを前記ガラス板と第三位置において接触せしめる；

o) 前記マスクを少なくとも紫外外により照らし、該紫外光が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

p) 前記少なくとも第一表面を第三アミノ酸に曝露し、該第三アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、該第三アミノ酸はその末端に前記光保護基を含んで成る；

Fを有する基体上で、第一の選択されたポリペプチドを照射することによって前記保護基を除去する；

q) 前記ポリペプチドを第一アミノ酸と接触せしめることにより第一配列を生成せしめ、前記基体上の第二ポリペプチドは第二配列を含んで成る；及び

r) 前記第一配列又は第二配列のいずれか前記受容体と結合するかを同定する；

段階を含んで成る方法。

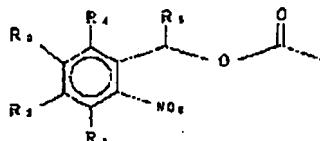
2.4. 選択のポリマーを製造するための装置であって、

a) エネルギー源への導線に際して活性化されてモノマーと反応する反応性部分を含んで成る表面を有する基体；及び

b) 前記表面の部分を前記エネルギー源から選択的に保護及び暴離するための手段；

を含んで成る装置。

2.5. 前記反応性部分が更に保護基を含んで取り、該保護基が次の式：



(式中、R₁はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、アルケニル又は水素であり；R₂はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、ニトロ又は水素であり；R₃はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、アリール、ニトロ又は水素であり；R₄はアルコキシ、アルキル、ハロゲン、ニトロ、アリール又は水素であ

安された領域に結合する；

e) マスクを前記ガラス板と第四位置において接触せしめる；

f) 前記マスクを少なくとも紫外外により照らし、該紫外光が前記マスクの前記第一場所下で前記ガラス板の前記少なくとも第一表面から前記光保護材料を除去する；

g) 前記少くとも第一表面を第四アミノ酸に曝露し、該第四アミノ酸は少なくとも第一表面の前記光保護材料が除去された領域に結合し、少なくとも第一表面は少なくとも第一、第二、第三、及び第四アミノ酸配列を含んで成る；

h) 前記少くとも第一表面を他の液体に曝露し、該液体の液体が前記第一、第二、第三又は第四アミノ酸配列の少なくとも1つにより強く結合する；

i) 前記少くとも第一表面を他の液体に曝露し、該液体の液体は前記注目の液体を認識しそしてその複数の場所において結合し、該液体はフルオレッセインを含んで成る；

j) 前記少くとも第一表面に光を暴露し、該第一表面は少なくとも前記より強く結合したアミノ酸配列が位置する領域において首先を絶する；並びに

k) 前記少くとも第一表面を横切る場所に開口として當光の強度を検出及び記録する；

2.3. 受容体との結合について少なくとも1つのペプチド配列を固定する方法であって、

l) 各々が光検出可能な保護基を有する複数のオリペプチ

ドを有する基体上で、第一の選択されたポリペプチドを照射することによって前記保護基を除去する；

m) 前記ポリペプチドを第一アミノ酸と接触せしめることにより第一配列を生成せしめ、前記基体上の第二ポリペプチドは第二配列を含んで成る；及び

n) 前記第一配列又は第二配列のいずれか前記受容体と結合するかを同定する；

2.6. 前記反応性部分が更にリンカー分子を含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.7. 前記リンカー分子がエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二酸、アトノ酸、及びこれらの組合せから成る等から選択されたものである、請求項2.6に記載の装置。

2.8. 選択的保護のための前記手段がさらにマスクを含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.9. 前記選択的保護のための前記手段が更に光バルブを含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.10. 前記エネルギー源が光源である、請求項2.4に記載の装置。

2.11. 前記反応性部分が更に、ニトロベラトリルオキシカルボニル、ニトロベンジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-ブロモ-2-ニトロイソドリニル、ヒドロキシ-2-メチルシンナセイル、及び2-オキシメチレンアンスラキノンから成る群から選択された組成物を含んで成る、請求項2.4に記載の装置。

2.12. その上に複数のアミノ酸配列を有する基体の製造のための装置であって、

a) 表面を有する基体；

b) 光、電子ビーム及びX-線放射から成る群から選択さ

れたエネルギー源への基盤の間に除去され得る、前記表面上の保護基；

c) 前記表面上の選択された場所に前記エネルギー源を用けるための手段；並びに

d) 前記表面への結合のために該表面にアミノ酸を導入するための手段；

を含んで成る装置。

3 3. 装置を有する基体を含んで成るポリマーをスクリーニングするための装置であって、該表面は少なくとも2層のあらかじめ定められた領域を含んで成り、該あらかじめ定められた領域はその上に異なるモノマー配列を含み、該あらかじめ定められた領域の各々が約0.1㎟未満の面積を占めるこことを特徴とする装置。

3 4. 前記面積が約0.01㎟未満である、請求項3 3に記載の装置。

3 5. 前記面積が10000㎟未満である、請求項3 3に記載の装置。

3 6. 前記面積が100㎟未満である、請求項3 3に記載の装置。

3 7. 前記モノマー配列が前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項3 3, 3 4, 3 5又は3 6に記載の装置。

3 8. その表面のあらかじめ定められた領域に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、生物学的活性についてスクリーニングするための基体。

成る第二表面とを有し、且つ少なくとも第一の成長の光に対して対称的に透過性である基体；

b) その内の反応活性空隙と共に観測表面を有する反応器体（前記第二表面が該観測表面と密封関係に維持される）；並びに

c) 前記基体の表面に向かられる、少なくとも前記の第一成長の光を発生するための光源；

を含んで成る装置。

4 8. 基体上の蛍光標識された領域を検出するための装置であって、

a) 前記基体の表面に光をむけるための光源；

b) 前記光源に応答して前記表面から発生した蛍光を検出する手段；

c) 前記基体を第一位置から第二位置に移行するための手段；並びに

d) 前記基体上の場所の間接として蛍光強度を検出するための、前記移行手段及び前記検出手段に連絡された手段；を含んで成る装置。

特表平4-505763(4)

3 9. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項3 8に記載の基体。

4 0. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くの異なるリガンドを含んで成る、請求項3 8に記載の基体。

4 1. 前記基体があらかじめ定められた領域内に10°又はそれより多くのリガンドを含んで成る、請求項3 8に記載の基体。

4 2. 前記リガンドがペプチドである、請求項3 8, 3 9, 4 0又は4 1に記載の基体。

4 3. 前記リガンドが前記あらかじめ定められた領域内で実質的に純粋である、請求項3 8に記載の基体。

4 4. 生物学的活性についてスクリーニングするための装置であって、

a) 様数のモノマー配列を含んで成る基体（該モノマー配列は該基体上の既知の場所において該基体の表面に結合されており、該配列の各々は約0.1㎟未満の面積を占めている）；

b) 蛍光標識により標識されており前記配列の少なくとも一つと結合する受容体に前記基体と暴露する手段；並びに

c) 前記基体上の前記蛍光標識の場所を検出するための手段；

を含んで成る装置。

4 5. 様数のポリマーを形成するための装置であって、

a) 少なくとも第一表面と光触法可能な保護材料を含んで

明細書

非常に大規模な固定化ペアド合成

著作権告白

本特許文書の一部は著作権保護にゆだねられる内容を含む。本著作権者は本特許文書又は特許開示が米国特許商標庁の特許登録中に存在する時いずれの者による複数再生に対しても再存はないが、その他の場合はいかなる場合もすべての著作権を留保する。

発明の背景

本発明は既知の場所における物質の合成及び配置に関する。特に、本発明の1つの般様は第一基体表面上の既知の場所における種々の化学配列の製造のための方法及び関連する装置を提供する。本発明は例えばオリゴマー、ペプチド、核酸、オリゴラッカライド、キヌアリビド、ポリマー等は医薬用製物の製造の分野において、特に生物活性についてのスクリーニングにおいて使用するための化学的多様性の原各創型するために適用される。

構造と分子の活性との関係は生物学的系の研究における基本的な事項である。構造-活性関係は酵素の機能、細胞が相互に連絡し合う方法、並びに細胞増殖及びフィードバック系を理解するために重要である。

ある種の大分子が、非常に特異的な三次元空間的及び電

子的分布を有する他の分子と相互作用しそして結合することが知られている。この様な特異性を有するすべての大分子は、それが代謝中間体の加水分解者触媒する酵素であるか、イオンの輸送者を中介する細胞表面蛋白質であるか、近傍の細胞に対して肯定の細胞を同定するのに役立つ細蛋白質であるか、血漿中で活用している Ig G-クラス抗体であるか、体内のDNAのオリゴヌクレオチド配列であるか等に拘らず、受容体 (receptor) と考えることができる。受容体が選択的に結合する種々の分子はリガンド (ligand) として知られる。

既知の受容体及びリガンドの結合親和性を測定するために多くの測定方法が利用可能であるが、この様な実験から得られる情報は利用可能なリガンドの数及びタイプによりしばしば制限される。新颖なリガンドは時として、偶然に、又は一級构造分析及び蛋白質のための還伝子組換技術を含めて、分子構造の解明のための新たな技術の適用により発見される。

小ペプチドは構造と生物学的機能との間の関連性を求めるための例示的系である。ペプチドはアミノ酸の配列である。20種類の天然アミノ酸がポリマー分子に結合されると、それらは広範囲の種類の三次元構造を形成し、それぞれには既定のアミノ酸配列及び培養条件に基づく。30種類の天然アミノ酸の可能なペントペプチドの数は、例えば 20^5 又は $3 \cdot 20 \cdot 1000$ の異なるペプチドである。このサイズの分子が受容体結合研究において有用であるらしいことは、幾つかの抗体が既知のアミノ酸という短い配列を高い特異性をもって

特表平4-505763 (6)

認識することを示すエピトープ分析研究により支持される。さらに、アミノ酸の平均分子量は小ペプチドを、多くの現在通用な医薬製剤のサイズ範囲に属く。

医薬の発見は、構造-活性関係のこの様な研究に頼る研究の1つのタイプである。ほとんどの場合、生物学的に重要な受容体に対する特異性の至ましいパターンを有する新規なリガンドを発見する過程として、同時代的医薬研究を記載することができる。尚の例は、農薬において使用するための新規な化合物、例えば吸虫剤及び除草剤を発見するための研究である。

時として、リガンドを設計するための合目的な工程の解決は困難であり又は努力耗り切れるものである。多数の異なるポリマーを調査するための従来の方針は、効率的で合理的な又はランダムなスクリーニングを可能にするのに十分な規模で用いられる場合、骨が折れるほど遅かった。例えば、固体支持体上のペプチドの合成のためにメリフィールド (Merrifield) 法 (*J. Am. Chem. Soc.* (1963) 85: 2149-2154) が使用されている。メリフィールド法においてはアミノ酸が不溶性ポリマーから作られた支持体に共有結合される。第一保護基を有する他のアミノ酸が、前記共結合したアミノ酸と反応してジペプチドを形成する。洗浄の後、保護基が除去され、そして第二保護基を有する第三のアミノ酸が側鎖ジペプチドに加えられる。この工程は、所望の長さ及び配列のペプチドが得られるまで繰り返される。メリフィールド法を用いる場合、1日に百を超えるペプチド配列を合成することは絶

説明の概要

種々のポリマーの合成のための改良された方法及び装置が開示される。

1つの好ましい概念においては、リンカー分子が基体上に与えられる。このリンカー分子の一端には、光除去可能な (photoremovable) 保護基により保護された反応官能基が設けられる。リソグラフ (lithography) 法を用いて、第一の選択された領域において、光除去可能な保護基が光に曝露されそしてリンカー分子から除去される。次に基体を洗浄し、又は第一モノマーと接触せしめる。この第一モノマーはリンカー分子上の露出された官能基と反応する。好ましい概念においては、モノマーはそのアミノ末端又はカルボキシ末端に光除去可能な保護基を含むアミノ酸であり、そしてリンカー分子は光除去可能な保護基を抱持するアミノ基又はカルボキシ酸基を末端として有する。

次に、第二セットの選択された領域を光に曝露し、そしてリンカー分子/保護されたアミノ酸上の光除去可能な保護基を該第二セットの領域において除去する。次に、基体を、暴落された官能基との反応のために光除去可能な保護基を有する第二モノマーと接触せしめる。所望の長さ及び所望の化学配列を有するポリマーが得られるまで選択的にモノマーを適用するためにその工程を反復する。次に、光感受性基を除去によっては除去し、そして次に配列を場合によつてはキャップする。個別保護基が存在する場合はそれらも除去される。

本明細書に開示するリソグラフ法を用いることにより、基

特許平4-505763(6)

体上の相対的に小さな且つ正確に知られた場所に光を向けることが可能である。従って、基体上の知られた場所において知られた化学配列のポリマーを合成することが可能である。

得られる基体は、例えば生物学的用途について多数のポリマーをスクリーニングすることを含めて種々の用途を有するであろう。生物学的用途をスクリーニングするためには、基体を又は複数の受容体、例えば抗体、全細胞、小胞上の受容体、脂質、又は他の種々の受容体のいずれかに暴露する。受容体は好ましくは例えば蛍光標識、放射能標識、又は受容体と反応性の標識された抗体により標識される。基体上の標識の位置は例えば光子検出器又はオートラジオグラフィー法により検出される。結合が検出される位置における物質の配列の知識を通して、どの配列が受容体を結合するかを迅速に決定することができ、そしてそれ故にこの技術を用いて多数のペプチドをスクリーニングすることができる。本発明の他の可能な用途には診断が含まれ、この場合、特定の受容体に対する種々の抗体が基体上に置かれ、そして例えば血管が免疫不全についてスクリーニングされるであろう。更なる用途には、例えば、半導体装置における有機物質の選択的「ドーピング」(doping)等が含まれる。

本発明の1つの要点に関して、ポリマーを合成するための選択された反応器系も開示される。この反応器系は、周辺付近で基体と適合する基台を含む。この基台は基体と適合との間に反応器空間を備えており、それを通して又はその中に反応液体がポンプ駆動され又は流れ、反応器空間中の基

体の選択された領域を既保護するように、基体上にマスクが置かれ又は集中され、そして照明される。モノマーが反応器空間を通ってポンプ駆動され又は基体と接触され、そして既保護された領域と反応する。基体上の領域を選択的に既保護し、そして反応空間を遮して所定のモノマーを流すことにより、知られた場所において所定のポリマーを合成することができる。

改良された検出装置及び方法も開示される。この検出方法及び装置は、基体の表面の知られた位置に非常に多様なポリマー配列を有する基体を用いる。基体は蛍光標識された受容体に暴露され、該受容体は又は複数のポリマー配列と結合する。基体は、結合が起った位置の特定のために原点検出装置内に置かれる。この原点検出装置は基体に光を向けるための単色光源又は多色光源、基体からの蛍光を検出するための平版、及び蛍光の場所を決定するための手順を含む。基体上の蛍光を検出するための平版は表つかの層においては電子カウンターを含むであろう。蛍光の位置を決定するための手段は基体のためのエノン移動(tonal shift)を含むであろう。スライドの移動及びデーターの収集は巡回にプログラミされたデジタルコンピューターにより実現されそして受達される。

本発明の性質及び利点の更なる理解は本明細書の残りの部分及び添付された図面への言及により実現されるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、第一場所における基体のマスク及び液槽を示す。基体は裏面として示されており；

図2は、モノマー「A」の適用後の基体を示す；

図3は、第二場所における基体の液槽を示す；

図4は、モノマー「B」の適用後の基体を示す；

図5は、「A」モノマーの液槽を示す；

図6は、「B」の第二の適用後の基体を示す；

図7は、完成された基体を示す；

図8A及び8Bは、基体上の複数のポリマーを形成するための反応器系のいずれか選択可能な具体例を示す；

図9は、基体上の蛍光標識の位置を決定するための検出装置を示す；

図10A～10Mは、モノマー「A」及び「B」のトリマーの製造に適用される場合の方法を示す；

図11A、11B及び11Cは、標準的蛍光ビーズについての蛍光追跡法であり；

図12A及び12Bは、それぞれ、光に暴露されていないNVOCスライド及び光に暴露されたNVOCスライドについての蛍光線であり；

図13A及び13Bは、標識されたHerr2抗体に暴露されたYCCFL及びPGFLのチャーンカーボードパターンを有するスライドの形状を示す；そして

図14A及び14Bは、2層の異なるガラススライド上で合成された16の配列のマッピングを示す。

特許の詳細な説明

四 次

I. 用語集

II. 一般

III. ポリマー合成

IV. 反応器系の1種類の詳細

V. 蛍光検出装置の1種類の詳細

VI. 受容体の結合結合度の決定

VII. 実施例

A. スライドの調製

B. 「A」及び「B」の3種のトリマーの合成

C. アミノ酸基及び氨基のダイマーの合成

D. シグナルの可視性の確認

E. 单位面積当たり分子の数の证明

F. NVOCの除去及び蛍光標識の付加

G. NVOCの除去におけるマスクの使用

H. YCCFLの付加並びにこれに続くPGFL液体及びヤギ抗マウスへの暴露

I. YCCFLのモノマー並列合成及びそれに続く標識された抗体への暴露

J. YCCFL及びPGFLのモノマー並列合成

K. YCCFL及びYPCCFLのモノマー並列合成

L. 16種類の異なるアミノ酸配列の並列の合成及びHerr2抗体に対する相対結合親和性の評価

M. 具体例の例示

II. 第一節

1. 構造

次の用語は、これらが本明細書において使用される場合、下記の一般的意味を有する。

1. 構造的

リガンド分子及びその受容体の相互作用する表面の形態的 (topological) 互換性又は一致度に関する。すなわち、受容体とそのリガンドは構造的であると記述することができ、そしてそれ故にその機能表面特性は相互に相容的である。

2. エピトープ

抗体として知られる受容体のサブクラスとの相互作用領域により指定される抗原分子の部分

3. リガンド

リガンドは特定の受容体により認識される分子である。本発明により研究され得るリガンドの例には、限定的ではないが、細胞膜受容体に対するアゴニスト及びアンタゴニスト、酵素 (coenzyme 及び enzyme)、ウイルスエピトープ、ホルモン (例えば、胰島素、成長ホルモン、アヘンホルム、ステロイド等)、ホルモン受容体、ペプチド、開拓、酵素基質、糖因子、蛋白、レクチン、糖、オリゴスクレオチド、核酸、オリゴサッカライド、蛋白質、及びモノクローナル抗体が含まれる。

4. モノマー

一緒に連結してポリマーを形成することができる小分子のセットの構成質。モノマーのセットは限定的ではないが例え

5. 受容体

所与のリガンドに対する親和性を有する分子。受容体は天然分子でも人造分子でもよい。さらに、これらはその活性化していない状態で又は他の種との複合体として用いることができる。受容体は共有結合により又は非共有結合により、直接に又は特定の結合物質を介して結合質に附加され得る。本発明により研究され得る受容体の例には、限定的ではないが、抗体、細胞膜受容体、特定の疾患決定基 (例えばウイルス、細胞又は他の材料上にあるもの) と反応するモノクローナル抗体及び抗体構造、蛋白、ポリスクレオチド、核酸、ペプチド、糖因子、レクチン、糖、オリゴサッカライド、細胞、細胞膜、及びオルガナボラが含まれる。受容体は時として脂質界において坑-オーガンドとも称される。本明細書において受容体なる用語が使用される場合、意味の相違は意図されない。2つの巨大分子が分子記載を介して結合して複合体を形成する場合、「リガンド受容体対」が形成される。

本発明により研究され得る受容体の他の例には次のものが含まれるが、これらに限定されない。

a) 病原生物受容体

病原生物の生存に必須な特異な結合蛋白質又は酵素のごとき、受容体に結合するリガンドの決定は新しいクラスの抗生物質において有用である。特に価値あるものは、日和見真菌、革兰陰性菌、及び現在使用されている抗生物質に対して耐性を有する細菌に対する抗生物質であろう。

特表平4-505763(7)

著者のL-アミノ酸のセット、D-アミノ酸のセット、L-αミノ酸のセット、スクレオペチドのセット、並びにペントース及びヘキソースのセットが含まれる。本明細書において使用する場合、モノマーはポリマーの合成のための基本セットのいずれかの構成員に関する。例えば、L-アミノ酸のダイマーはポリペプチドの合成のための400のモノマーの基本セットを構成する。モノマーの異なる基本セットはポリマーの合成における選択段階で使用されるであろう。

5. ペプチド

モノマーがα-アミノ酸であり且してアミド結合を介して一緒に結合しているポリマーであって、ポリペプチドとも称する。この用語等の文献において、アミノ酸はL-光学異性体又はD-光学異性体であり得る。ペプチドは2より多くのアミノ酸モノマーの長さを有し、そしてしばしば20より多くのアミノ酸モノマーの長さを有する。アミノ酸のために標準的な略号が用いられる (例えば、プロリンについてはP)。これらの略号はStryer, Biochemistry, 第3版、1988に含まれており、これをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる。

6. 放射

例えば、電子ビーム放射、γ-放射、X-線放射、紫外線放射、可視光、赤外線放射、マイクロウェーブ放射及びラジオ波を含む10⁻¹¹メートル及び10⁴メートルの間の波長を有するエネルギーを含めて、選択的に選用され得るエネルギー。「照射」とは、表面への放射の選用を意味する。

b) 脱落

例えば、神経伝達物質の翻訳を担当する酵素のごとき酵素の結合部位；與る神經伝達物質を翻訳せしめる酵素の作用を変更するある種の受容体に結合するリガンドの決定は、神經伝達の不全の治療において使用され得る薬剤の開発において有用である。

c) 抗体

例えば、本発明は、注目の抗原のエピトープと結合する抗体分子上のリガンド結合部位の研究において有用であり、抗原性エピトープを認識する配列の決定はウクチンの開発を導くことができ、族ウクチンの免疫原は1又は複数のこの複数配列に過ぎず、あるいは前記決定は複数的処理において、例えば自己免疫疾患に対して (例えば「自己」抗体の結合をブロックすることにより) 有用な調査薬剤又は化合物の開発を導くことができる。

d) 接触

核酸の配列を合成してDNA又はRNA合成配列を樹立することができる。

e) 特異的ポリペプチド

1又は複数の反応体の1又は複数の生合成への転換を含む化学反応を促進することができるポリマー、詳しくはポリペプチド。この種のポリペプチドは一般に少なくとも1つの受容体又は反応中間体に対して特異的な結合部位、及び該結合部位の近くにある活性官能基を含み、この官能基は結合した受容体を化学的に変形することができる。特異的ポリペプ

手本は例えば米国特許出願No.104,620に記載されており、これらをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

「」ホルモン受容体

例えば、インシュリン及び成長因子のための受容体。高い親和性をもつて受容体に結合するリガンドの決定は、例えば糖尿病の症状の改善のために糖尿病患者がどうなければならぬ日常的な注射に代る経口投与の開発、及び他の場合、死体から又は組織由 DNA 技法によってのみ得ることができる少ヒト成長ホルモン代替において有用である。他の例は血管収縮ホルモン受容体であり、受容体に結合するリガンドの決定は血圧を抑制する薬剤の開発を導くであろう。

5) あへん(アヒン) 哽聲

脳におけるもへん受容体に結合するリガンドの決定はそれ フィン及び間連菌糸の致死性の少ない代替物の開発において 有用である。

8. 病案

便質又は半便質表面を有する材料。多くの樹脂例においては基体の少なくとも1つの表面は質的に平らであるが、我々の樹脂においては、異なるポリマーのための合成分接を例えばウエル、隆起した頸部、エッティングされた構造による物理的に分離するのが面白い。他の具体例に姑えれば、合成の完了の後に放出される小ピーズを表面に加えることができる。

9. 爱丽丝

モノマー・ユニットに結合しており、そして電磁誘導のこと
もアクチベーターへの暴露に際して空間的に除去される材料。

発明はこの明細書において主として、アミノ酸の配列を含む分子の製造に関して記載されるが、しかし他のポリマーの製造にも容易に適用することができる。この様なポリマーには、例えば、核酸の複数核及び重複ポリマー、ポリラッカライド、リン脂質、オーラ、ヌー-又はヒー-アミノ酸を有するペプチド、上記のいずれかに既知の蛋白質が共存組合しているヘテロポリマー、ポリウレタン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリウレア、ポリアミド、ポリエテレンイミン、ポリアリーレンスルフィド、ポリシロキサン、ポリイミド、ポリアセチート、あるいはこの開示の構成の後に明らかになるであろう他のポリマーが含まれる。好ましい態様において、本発明はペプチドの合成に使用される。

調製された基体は、例えば、受容体との結合のためのリガンドとして種々のポリマーをスクリーニングするのに使用されるが、しかし本発明はリガンドと結合する受容体の合成のためにも使用することができる。この明細書に開示される基体は、広範な種類の他の用途を有するであろう。舉に例として、本明細書において本発明は蛋白質に結合する核糖配列及びペプチド配列の決定、既知特異的結合薬剤の発見、抗体により認識されたエピトープの同定、並びに臨床的及び診断的用途並びに上記の組合せのための種々の薬剤の経験において、使用される。

本発明は好んでしくは、表面を有する基体「S」の使用を選択する。場合によっては基体の表面にリンカー分子「L」が与えられる。幾つかの態様において、リンカーの目的は合成

特表平4-505763(8)

本発明において用途を有する銀選基の例にはエトロペーテトリルオキシカルボニル ($\text{N}=\text{C}(\text{O}\text{C}_2\text{H}_4\text{OC}_2\text{H}_4\text{O})_2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}\text{C}(=\text{O})$)、エトロベンジルオキシカルボニル、ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル、5-ブロモ-1-エトロインドリニル、9-ヒドロキシ- α -メチルシンナセイル、及び2-オキシメテレンアソスラキノンが含まれる。アクチベーターの他の例にはイオンビーム、電界、磁界、電子ビーム、X-線等が含まれる。

10. 所處の領域

所定の領域とは、ポリマーの形成のために活性化されたか、活性化されているか、又は活性化されることが意図される表面上の位置決定された領域である。所定の領域は位置の便利な形狀、例えば円形、長方形、橢円形、くじら形等を有することができる。本明細書において簡略化のため、「所定の領域」を特ととして單に「領域」と称する。

1. 要覺的危險性

具体的の 1 つの所定の領域がそれを他の所定の領域から区別する特性を示す場合、ポリマーは所定の領域内で「実質的に純粋である」と考えられる。典型的には純度は、均一な配列の結果としての生物学的活性又は媒能として測定されるであろう。この特徴は典型的には選択されたリガンド又は受容体との結合により測定されるであろう。

8.

本発明は、複数の所定の領域に複数のボリマー配列を有する基体の調製及び使用のための方法及び装置を提供する。本

されたポリマーの安寧体構造を促進することである。

場合によっては、リンカーフィン子は貯蔵の目的のために化学的に保護されていてもよい。数つかの崩壊においては $-B_0C$ ($\text{L}-\text{ブロキシカルボニル}$) のごとき化学的保護基を用いることができる。この様な化学的保護基は、例えば酸性溶液への暴露の後に化学的に除去され、そして貯蔵の間に表面を保護するために投立てられておりマーの問題に先立って除去されるであろう。

基体又はリンクマー分子の適位末端に保護基P₁を有する官能基が与えられる。保護基P₁を放封、電界、電流又は他のアクチベーターへの曝露に照して除去して官能基を露出させることができる。

好ましい基板において、放電は紫外線(UV)、赤外線(IR)又は可視光である。積でさらに十分に遮蔽するよう、保護基は、電界の存在下で除去され得る電気化学的に感光性の基であることもできる。さらに他の基板においては、脱保護のためにイオンビーム、電子ビーム、等を使用することもできる。

幾つかの結構においては、暴露される領域、そしてそれ故に各異なるポリマー配列がその上で合成される範囲は約1 μ より小さく又は1 μ ²未満である。好ましい結構においては、暴露される範囲は約10, 000 μ^2 未満であり、さらに好ましくは100 μ^2 未満であり、そして幾つかの結構においては單一分子と同様に少數のための結合部位を含むことができる。これらの領域内で、各ポリマーは好ましくは質的に

純粋な形で合成される。

光への基体の既知領域の暴露と同時に又はその後に、波固を用一モノマーエニットM₁と接触させ、このユニットは既保有段階において露出された官能基と反応する。第一モノマーは保護基P₁を含有する。P₁はP₂と同じでもよく又は異っていてもよい。

従って、第一サイクルの後、表面の既知第一領域は次の配列：

S-L-M₁-P₁

を含んで成り、他方表面の残りの領域は次の配列：

S-L-P₂

を含んで成る。次に、表面の第二領域（これは第一領域を含むことができる）を光に曝露し、そして保護基P₂を有する第二モノマーM₂（これはM₁と同一でもよく、又は異っていてもよい）と接触せしめる。P₂はP₁及びP₃と同一でもよく、又は異っていてもよい。この第二サイクルの後、基体の露る領域は次の配列：

S-L-M₁-M₂-P₂

S-L-M₂-P₂

S-L-M₁-P₂ 及び／又は

S-L-P₃

の1又は複数を含んで成るであろう。基体が所望の長さの所望のポリマーを含育するまで上記の工程を反復する。光に曝露される基体の増加及び基体に統合基体に保護される試運を開始することにより、各配列の端端が知られるであろう。

以上の動機に従えば、第一モノマー層のために1セットのマスクが使用され、そして次に選択的脱保護のために種々の波長の光が用いられる。例えば、前に検討した工程において、第一領域をまずマスクを介して曝露し、そして第一波長の光（例えばUV）への暴露に際して除去され得る第一保護基P₁を有する第一モノマーと反応せしめる。第二胡塗マスクし、そして第二波長の光（例えばUV）への暴露に際して除去され得る第二保護基P₂を有する第二モノマーと反応せしめる。この後、既保護サイクルにおいて基体全體を第一波長の光及び第二波長の光に交互に曝露することができますから、合成においてマスクは不必要となる。

上記の方法に従って基体上で合成されたポリマーは、例えば生物学的活性のスクリーニングを含めて種々の用途を有するであろう。このようなスクリーニング活動において、配列を含む基体は、標識されていないか又は標識されている受容体、例えば抗体、細胞上の受容体、リン脂質小胞、又は他の種々の受容体のいずれかと接触される。1つの好みしい技術においては、ポリマーはまず生目の第一の半導體基体に導入され、そしてその後で、例えば抗体である標識された受容体特異的認識装置に曝露される。この方法は検出段階でのシグナルの増幅をもたらすであろう。

受容体分子は基体上の1又は複数のポリマーと結合することができる。標識された受容体の存在、そしてそれ故に該受容体と結合する配列の存在が好みしい想換においてはオートラジオグラフィーの使用、電荷カップリング（charge

特許平4-505763 (9)

次に、基体の端もか又は全部から保護基を除去し、そして場合によっては配列をキャップユニットCによりキャップする。この工程が、次の一般式：

S-(L)-(M₁)-(M₂)-(M₃)…(M_n)-(C)

(式中、中カッコ()は場合によっては存在する基を示し、そしてM₁～M_nはモノマーの任意の配列を示す)

により示される環状のポリマーを持つ表面を有する基体をもたらす。モノマーの数は広範囲の数にわたることができるが、しかし好みしい基体においてはそれは2～100の範囲であろう。

幾つかの動機においては、基体上の複数の場所でモノマーは共通のモノマーアップ配列を含むべきである。例えば、第一の場所において配列S-M₁-M₂-M₃をそして第二の場所において配列S-M₁-M₂-M₃を合成することが望ましいであろう。この工程は第一の場所の照射をもって開始され、これに続くM₁-P₁との接触が第一場所での配列S-M₁-P₁をもたらす。次に第二場所を照射しそしてM₂-P₂と接触させて第二場所での配列S-M₁-P₁-M₂を得る。次に、第一場所及び第二場所の両方を覆射し、そしてダイマーM₁-M₂と接触せしめることにより第一場所における配列S-M₁-M₂-M₃、及び第二場所における配列S-M₁-M₂-M₃を得る。言うまでもなく、任意の長さのサブ配列を用いることができる、これには2以上の範囲のモノマー、2～100個のモノマー、2～20個のモノマー、そして最も好みしくは2～3個の範囲モノマーが含まれる。

-c o u p l e d) 装置による色彩の検出、蛍光顕微鏡等により検出される。受容体の結合が検出される場所におけるポリマーの配列を用いて該受容体に対して相補的である配列の全部又は部分を決定することができる。

本明細書において本発明の利用は主として生物学的活性についてのスクリーニングに旨しながら説明される。しかしながら、本発明は他の多くの用途を有する。例えば、本発明は情報の格納（例えば、光ディスク上での）、分子電子装置の製造、分離科学（separation science）における高分子の合成、染料及び増白剤の製造、写真、並びに若狭的ポリマー配列の分子認識を介しての表面上のパターンにおける細胞、蛋白質、レクチン、糖類、オリゴヌクレオチド等の固定化、において使用することができる。同じ化合物を接続して段々と異なる濃度で合成することにより、活性化を制御するため又は例えば増加する量の抗原に対して抗体を効率的に固定するため又は例えは接着剤（adhesive）を発光するために勾配が設立されるであろう。幾つかの複数分子を連接して合成することにより、より効率的な多段階合成によって「座標固定化」（coordinate immobilization）が達成され得る。座標固定化はまた、電子伝達系のため、並びに構造的完全性及び他の好みしい性質、例えば活性、選択性等を有るために用いることができる。

他の動機に従えば、分子生物学分配及び座標固定化特性を比較することができる。例えば、陽アロテアーゼ又は血清プロテアーゼに対する耐性を評価するため、ポリマーを蛍光タグ

によりキャップし、そして社の生物学的液体に暴露することができる。

四. ポリマー合成

図1はこの明細書に開示される本発明の1つの態様を示し、ここでは基体2が断面として示される。本質的に、任意の便利な基体を本発明において使用することができる。基体は生物学的、非生物学的、有機、無機、又はこれらの任意の組合せであることができ、粒子、ストランド、沈澱、ゲル、シート、チューブ、線状体、容器、毛細管、パッド、スライス、フィルム、プレート、スライド等として存在する。基体には意の便利な厚さ、例えばディスク、正方形、円形であることことができる。基体は好みの平らであるが、他の種々の表面構造を取るであろう。例えば、基体はその上で合成が行われる医薬品又はくばんだ領域を含むことがある。基体及びその表面は好みしくは、本明細書に記載する反応がその上で起る便利の支持体を取る。基体及びその表面はまた、適切な吸光特性を与えるように選択される。例えば、基体は、混合したラングミュア・プロゼットフィルム（Langmuir-Blodgett film）フィルム、官能化されたガラス、Si、Ge、GaAs、GeP、SiO₂、SiN_x、改質シリコン、又は広範囲の種類のゲル又はポリマー、例えば【ボリ】テトラフルオロエチレン、【ボリ】ビニリデンジフルオリド、ポリステレン、ポリマーグリーン、又はこれらの組合せであることができる。他の基体材料はこの開示を標榜した後に当業者にとって明らかであろう。好みの貼接にお

ためには8~50原子の量を有すべきである。リンカーフィラメントは例えばアリールアセチレン、2~10個のモノマーユニットを含むエチレングリコールナリゴマー、ジアミン、ジアレード、アミノ酸、又はこれらの組合せであることができる。この開示に従うして他のリンカーフィラメントを使用することもできる。

他の態様に従えば、ある種の受容体への合成されたポリマーの投出を改良するために、リンカーフィラメントはそれらの親水性/疎水性表面に基づいて選択される。例えば、親水性受容体の場合、被受容体が合成されたポリマーに一度直接に接近することを許容するように、親水性リンカーフィラメントが好み。

他の態様に従えば、リンカーフィラメントはまた中間位置に光解説性基を備える。この光解説性基は好みしくは疎水性基とは異なる波長において開裂される。このことが、異なる波長の光への暴漏による合成の完了後の種々のポリマーの取り出しを可能にする。

リンカーフィラメントは、例えば【ボリ】トリフルオロクロロエチレンを用いて從属-脱離結合を介して、又は好みしくはシロキサン結合により（例えば、ガラス又は酸化珪素表面を用いて）基体に付加することができる。基体の表面とのシロキサンの結合は、1つの態様においては、トリクロロシリル基を保持するリンカーフィラメントの反応を介して形成される。リンカーフィラメントは場合によっては指定された整列で、すなわち整合されたラングミュア・プロゼットフィルム中のヘッドグループ（head group）の部分として取付けられる。

特表平4-505763 (10)

いて、基体は10人米溝の表面レリーフ特性を有する単結晶シリコン又は平らなガラスである。

幾つかの態様に従えば、基体の表面はよく知られた方法によりエッチングすることにより所望の表面特性を与える。例えば、南、V-底溝、メーナ（台地）構造等の形状により、合成領域を突き当たる光の焦点内により密に置くことができ、蛍光源等からの輻射の最大化のための反射「鏡」構造を得ることができる。

固体基材の表面は通常、常にではないが、基体と同じ材料で構成される。すなわち、表面は広範囲の種類の材料のいずれか、例えばポリマー、プラスチック、樹脂、ポリサッカライド、シリカもしくはシリカを基材とする材料、炭素、金銀、無機ガラス、膜、あるいは前に挙げた基材材料のいずれかから構成される。幾つかの態様において、表面は、すでに引用した出願番号10404,920の教示に従う基材の表面に堅く結合したかこまれた【case 4】結合層の使用を提供する。好みしくは、表面は反応性基を含み、この基はカルボキシル、アミノ、ヒドロキシル等であることができる。さらに好みしくは、表面は光学的に透明であり、そしてシリカ表面に見られるように表面SトーラK室能基を有するであろう。

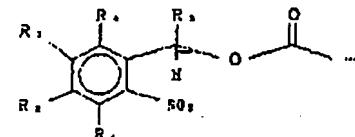
基体の表面4は好みしくはリンカーフィラメントを有するが、リンカーフィラメントは本発明の必須の要素ではないと理解されよう。リンカーフィラメントは好みしくは、合成された基材中のポリマーが基材に暴露された分子と自由に接觸することを許容するのに十分な長さを有する。リンカーフィラメントは十分な暴露を提供する

他の情報においては、リンカーフィラメントは基材の表面に吸着される。

本発明において使用されるリンカーフィラメント及びモノマーは、保護基が結合した官能基を有する。好みしくは、保護基は基材とは反応側のリンカーフィラメントの逆側端又は末端に存在する。保護基は良い保護基（すなわち、暴露の後にリンカーフィラメントとモノマーとの反応性を低下する保護基）又は正の保護基（すなわち、暴露の後にリンカーフィラメントとモノマーとの反応性を低下する保護基）のどちらでもよい。良い保護基の場合、反応活性化の段階が必要であろう。幾つかの態様においては、それは加熱により行われるであろう。

リンカーフィラメント上の保護基は広範囲の種類の正の光反応性基から選択することができ、これには好みしくはニトロ芳香族化合物、例えば6-ニトロベンジル誘導体又はベンジルスルホニルが含まれる。好みの態様において、6-ニトロベラトリルオキシカルボニル（NVO₂C）、2-ニトロベンジルオキシカルボニル（NBO₂C）又はα, α-ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル（DDOZ）が使用される。

1つの態様においては、ニトロ基に対してもアルト位にベンジル性水素を含有するニトロ芳香族化合物、すなわち、次の式：



特許平4-505763 (11)

(式中、R₁はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、アルケニュル又は水素であり；R₂はアルコキシ、アルキル、ハロ、アリール、ニトロ又は水素であり；R₃はアルコキシ、アルキル、ハロ、ニトロ、アリール又は水素であり；R₄はアルコキシ、アルキル、水素、アリール、ハロ又はニトロであり；そしてR₅はアルキル、アルキニル、シアノ、アルコキシ、水素、ハロ、アリール又はアルケニュルである)で表される化学物質が使用される。使用し得る他の物質には0-ヒドロキシ-α-メチルシンナモイル酸基が含まれる。光吸收可能な保護基は例えばPatchornik, *Jpn.Chem.Soc.* (1970) 93 : 6333及びHallら, *J.Org.Chem.* (1974) 39 : 192に記載されている。これらを引用により本明細書に組み入れる。

他の領域においては、正の反応性基が溶媒中の状態との反応のために活性化される。例えば、5-ブロモ-7-ニトロイソアリン基は、カルボニルに結合する場合、420 nmの光への曝露の際に反応する。

第二の領域においては、リンカー分子上の反応性基は、シンナメート基を含めて広範囲の種類の次の反応性基から選択される。

あるいは、反応性基は電子ビームリソグラフィー、X-線リソグラフィー、又は他の技術により活性化又は不活性化される。電子ビームリソグラフィーのための通常な反応性基にはスルホニルが含まれる。例えば電波源への曝露を含めて他の方法を使用することもできる。この開示に従事して他の反応性基及び活性化方法を使用することもできる。

Phys.Lett. (1977) 51 : 426-429(これを引所により本明細書に組み入れる)に記載されている様な干渉 (Interferometeric) 技術を用いることができる。

基体に当たられる光のコントラストを増強するため、幾つかの技術に従事すれば、マスクと基体との間にコントラスト増強材料を設けるのが好ましい。このコントラスト増強層は光により分解される分子、例えばキノンジアジド、又は柱の表面において一時的に漂白される物質を含んで成ることができる。物質の一時的漂白は、光が当たられた場所でのより大きな透過を可能にし、これによりコントラストが増強されるであろう。あるいは、コントラストの増強は、クラッド型ファイバー束(cladded fiber optic bundle)により得ることができる。

光は常用の白熱灯、レーザー、レーザーダイオード等からのものであることができる。非平行光源が使用される場合、基体への光の反射を防止するため厚いマスク又は多層マスクを用いるのが好ましい。さらに、幾つかの技術においては、合成を制御するために異なる被覆に対して感受性の基を用いることが望ましい。例えば、異なる被覆に対して感受性の基を用いることにより、ポリマーの合版における該位置を選択しえあるマスキング段階を省くことができる。幾つかの反応は基をその被覆のための対応する波長と共に表1に示す。

図1に示すように、連結分子は好ましくは、例えば、半導体工場において知られておりをして例えばSze, *VLSI Technics*, McGraw-Hill (1983)、及びHeadら、*Introduction to VLSI Systems*, Addison-Wesley (1980)(これらをすべての目的のために引用により本明細書に組み入れる)において知られているタイプのリソグラフィー技術を用いて、適切なマスクBを介して光に曝露される。光を、保護基を含む基底に、又は保護基の除去のために必要とされる光の波長に対して基体が通過性である限り基底の背後に向けることができる。図1に示す態様においては、光は保護基を含む基体の表面に向けられる。図1はこの様なマスク技術の使用を示し、これらの技術は図表1-a及び1-b中の連結分子を活性化しそして官能基を露出させるために正の反応性基に適用される。

マスクBは、1つの層においては、不透明な材料の層により部分的に被覆された透明な支持体构成である。不透明材料の部分が露され、不透明材料は所望の正確なパターンで支持体表面に残る。図1に示すように、マスクBは基体表面と直接に接触され、その上に投影され、又はそれに近づけられる。マスクの「開口部」は、光除去可能な保護基を基体から除去することが望まれる基体上の場所に対応する。専用の整合 (alignment) 技術を用いて結合を行うことができ、この場合、空白マーク(示してない)を用いて、事前のパターン化段階を経たマスクが次々と正確に重複され、あるいはより複雑な技術が使用される。例えば、Flandersら、「A New Interferometric Alignment Technique」, *App.*

表1

基	およその活性化波長
ニトロペラトリルオキシカルボニル(390C)	UV(300-400nm)
ニトロベンジルオキシカルボニル(380C)	UV(300-350nm)
ジメチルジメトキシベンジルオキシカルボニル	UV(280-300nm)
5-ブロモ-7-ニトロイソアリニル	UV(420nm)
0-ヒドロキシ-α-メチルシンナモイル	UV(300-250nm)
2-オキシメチレンアンスラキノン	UV(350nm)

本明細書においては、本発明を主として基体の選択された領域を明確にするためのマスクの使用により説明するが、他の技術を用いることもできる。例えば、変調されたレーザー又はダイオード光波のもとで基体を露することができる。この様な技術は例えば米国特許No.4,719,615(Feyrerら)に記載されており、引用によりこの明細書に組み入れる。他の技術においては、レーザーメータースキャナーが用いられる。他の技術においては、常用の装置(本明細書で「光バルブ」と示す)又は光ファイバ光導管上で又はそれらと接続して合成を行うことができる。装置を適切に調整する(moderate)ことにより、光が基体上の選択された領域に接するように光を選択的に制御することができる。あるいは、光が選択的に当たられる一連の光ファイバーの先端で合成を行うことができる。先の基体の場所を翻訳するための手段は当業者に明らかであろう。

基体は複数（示していない）と接触して又は接触しないで照射されることがある、そして好ましくは塔波と接触して照射される。幾つかの結構に従えば、この構造は、照射により生成した副生成物がポリマーの合成分を妨害するのを防止する試薬を含有する。この種な副生成物には例えば二酸化炭素、ニトロソカルボニル化合物、ステレン誘導体、インドール誘導体、及びそれらの光化学反応の生成物が含まれよう。あるいは、接觸は基体の遮蔽率を最大化するための試薬を含有することができる。接觸に接觸される試薬にはさらに、例えば、酸性もしくは塩基性の緩衝剤、チオール、置換されたヒドrazin及びヒドロキシルアミン、還元剤（例えばNADH）、又は所与の官能基と反応することが知られている試薬（例えば、フリールニトロソガリオキシル酸のアリールホルムヒドロキサノート+CO₂）が含まれる。

照射領域と同時に又はその後に、リンカーフィクスを洗浄し、あるいは図2中の領域12a及び12bに「A」で示される第一モノマーと接觸せしめる。第二モノマーは、先に暴露された接觸分子の活性化された官能基と反応する。好ましくはアミノ酸である第一モノマーはまた光保護基を備えている。セノマー上の光保護基は連結分子中に用いられた保護基と同一でも又は異っていてもよく、そして前記の保護基のいずれかから選択される。1つの結構においては、Aセノマーのための保護基は既NBOC及びNVOOCから選択される。

その後、図3に示すように、先行するマスキング領域において保護されていた領域として示される領域14a及び

領域においては、領域12及び16は約10⁻¹cm、10⁻²cm、10⁻³cm、10⁻⁴cm、10⁻⁵cm、10⁻⁶cm、10⁻⁷cm、10⁻⁸cm、10⁻⁹cm又は10⁻¹⁰cm未満の面積を有する。好ましい構造においては、領域12及び16は約10×10mmと500×500mmとの間である。

幾つかの構造においては、第一の基体は10種類より多くのセノマー配列を支持し、そして好ましくは100種類より多くのセノマー配列を支持しており、但し幾つかの構造においては約10°、10°、10°、10°、10°、10°又は10°種類より多くの異なる配列が1つの基体に与えられる。音よりもなく、セノマー配列が合成される基体の1領域内で、セノマー配列が実質的に純粋であることが好ましい。幾つかの構造において、基体の領域は少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の純度を有する。

幾つかの構造に従えば、生物学的活性の最初のスクリーニングを提供するために单一の領域内に意図的に幾つかの配列をもつて、次に有効な結合を示す領域内の物質をさらに評価する。

IV. 適応範囲の1つの構造の詳細

図6Aは、水溶液の1つの観点に従って構成された基体上にポリマーを合成するための反応器第100の好ましい構造を示す。この反応器第100はその表面上に空洞104を有する底部102を含む。好ましい構造においては空洞は約50～

特表平4-505763 (12)

146中のリンカーフィクスを除去しそして試薬を露出するように位置変更されたマスクを用いて照射の工程を反復する。第一マスクの位置変更の1つの選択法として、多くの構造において第二マスクが使用されるであろう。他の構造においては、幾つかの経路が接觸の逐次段階における接觸領域の照射をもたらすであろう。図3に示すように、照射された接觸領域の分離をもたらすのが望ましい。例えば、並列の許容のためには約1～5mmの分離が適当であろう。

次に、図4に示すように、基体を第二の保護されたモノマー「S」に露呈してB領域16a及び16bを生成せしめる。次に、A領域12a及びB領域16b上の保護基を除去しそして反応性部を露出するように基体を弄びマスクする。基体を弄びモノマーBに暴露し、図6に示す構造の層状をもたらす。ダイマーB-As及びB-Bが基体上に生成されている。

Aについて上に記載したのと同様の引き続く一連のマスキング及び接觸段階（示していない）が図7に示す構造をもたらす。この方法は、B及びAのすべての可能なダイマー、すなわちB-A、A-B、A-A、及びB-Bをもたらす。

結合領域、及び各個々のポリマーの合成のための領域は通常のサイズ及び形状のものでよい。例えば、正方形、横円形、長方形、三角形、円形、又はこれらの部分、並びに不規則な複雑な形状を使用することができる。冗長性の目的で同一の基体に2連の合成領域を適用することもできる。

1つの構造においては、基体上の領域12及び16は約1cmと10⁻¹⁰cmとの間の表面積を有するであろう。幾つかの

1000nmの深さを有し、約500nmの深さが好ましい。

空洞の底には好ましくは直径106の壁面が設けられており、この壁面はこの圓の平面に、及び圓の平面に対して平行に伸びている。壁面は好ましくは約50～200nmの深さを有しそして約2～3mmの面積を有する。壁面の目的はより良い混合のために混流を生じさせることである。空洞の底面は、突き当たる光の反射を防止するために、好ましくは吸光性である。

基体12は空洞104の上方に配置される。基体にはその底部表面にそって、介在するリンカーフィクス分子を伴って又は伴わないでNVOOCのごとき光除去可能な保護基が設けられる。この基体は好ましくは広いスペクトルの光に対して透過性であるが、しかし幾つかの構造においては当該保護基を除去する波長に対してのみ透過性である（例えば、NVOOCの場合UV）。幾つかの構造において、基体は常用的の耐候性ガラススライド又はオバースリップである。基体は好ましくは、適当な物理的支持を提供しながら可燃性腐食性である。好ましくは、基体は1mm未満の厚さを有し、さらには好ましくは0.1mm未満の厚さを有し、そして最も好ましくは0.05mm未満の厚さを有する。他の好ましい構造においては、基体は石英又はシリコンである。

基体及び体部は入口108及び出口160を含む空洞を封止するために接着剤、幾つかの構造においては、体部及び基体は1組又は複数個のマスケットによって封止のために適合

していてもよい。好ましい態様に従えば、体部は2個の同心ガスケットを有し、そして介在する空間はガスケットへの液体の詰合を強調するために真空状態で維持される。

液体は、例えばエルデックス・ラボラトリーズ (El d e x Laboratory!) により製造されたモデルNo.B-120-Sでもよいポンプ116により前記入口を通じて空洞にポンプ給送される。送入された液体はポンプにより空洞に入り、隔壁洞を通過しそして出口から出て循環され、さらに反応槽されるか又は閉鎖される。該つかの態様においては搅拌を助けるため反応槽を周囲冷却にかけ、及び/又は加熱してよい。

液体112の上方にはレンズ120が設けられており、このレンズは例えば2インチ100mm焦点距離の特種シリカレンズであってもよい。コンパクトな系のためには、光路124からの光を基体に向けるため反射鏡122を設けてよい。光路124は例えば、オリエル (Or lie l) により製造されたりとしてモデルNo.66024を有するXe(Hg)光源であることができる。第二レンズ128はレンズ112と組合わされてマスクイメージを基体に投影する目的で設けることができる。リングラフィーのこの形態を本明細書において投影プリントングと称する。この顯示から明らかのように、該つかの態様に従えば近接プリンティング (proximally printing), 等を用いることができる。

光源からの光は、マスク128の結果として基体の遮蔽された場所にのみ到達することが許される。マスク128は樹

特表平4-505763(13)

えば、その上にエッティングされたクロムを有するガラススライドである。1つの隙縫においてマスク128は透過性場所と不透過性場所の格子を有する。この様なマスクは例えばフォト・サイエンス社 (Photo Sciences, Inc.) により製造されるであろう。光はマスクの透明領域を自由に通過するが、しかし他の領域においては反射されるか又は吸収される。従つて、基体の遮蔽された場合のみが元に暴露される。

前記のように、基体の領域を選択的に曝露するために専用のマスクに代えて光バルブ (LCD) を用いることができる。あるいは、マスクのコントラストの強化の目的で又は光が当たられる領域を規定する唯一の手段として、ショット・グラス社 (Schott Glass, Inc.) から入手できるような光ファイバーフュースプレート (fiber optic faceplate) を用いることができる。この様なフェースプレートは図8Aに示される反応器中の基体上又はそのすぐ上方に置かれるであろう。さらに他の態様においてはコントラストの増強のためにフライスアイ (flys-eye) レンズ、サーバー曝光ファイバーフェースプレート等を用いることができる。

光の放散より小さい領域の照射を得るためにさらに精巧な技術を用いることができる。例えば、好ましい態様に従えば、例えばマイクロビットの先端の分子マイクロクリスタルにより光が基体に向けられる。この様な装置は Liebermanら 「A Light Source Smaller Than the Optical Wavelength」, Science (1950) 247 : 59-61 に記載されており、これをすべての目的的引層により本明細書に組み入れる。

操作において、液体を空洞上に置き、そしてそれに対しても止する。基体を切断する工程のすべての操作は、主として又は全体として、保護蓋を除去する前の光路団体の被長の光により覆らされた室内で行われる。例えば、N V O Cの場合、UV光をほとんど又は全く提供しない専用の射出光により室が照らされるべきである。すべての操作は、好ましくはおよそ空氣において行われる。

まず、脱保護液体 (モノマーを含まない) が空洞を通して循環される。この液体は好ましくはジオキサン溶液中5wt%硫酸であり、この溶液は露出したアミノ基をプロトン化し続けるために役立ちそして先分解酵母成物とのそれらの反応性を低下させる。この脱保護液体には、例えば、光を吸収しそして反射及び不希望の光分離を遮断するために役立つN,N-ジエチルアミノ2,4-ジニトロベンゼンのごとき吸収剤を含めることができる。

次に、スライドをマスクからの光路に配置して基体上の第1場所が照明されるようにし、そして次に脱保護する。好ましい態様においては、基体を約1~1.5分間照明する。好ましい照明時間は36.5nmの光で10~20mW/cm²にて約1.0分間である。光分離の後、例えば塩化メチレンやジーアソビロビルエチルアミン (D1EA) の溶液により約5分間スライドを中和する (すなわち約7のpHにする)。

次に、第一モノマーを基体上の第一場所に置く。照射の後、スライドをはずし、しばらくして処理し、そして流れセル中に再設置する。あるいは、好ましくはやはり保護蓋により保護

されている第一モノマーを含有する液体をポンプ116により空洞を遮して循環させる。例えば、第一場所で基体にアミノ酸を結合させることが望まれる場合、アミノ酸 (その他の型別に保護基を保持する) 及び第一モノマーを反応性にするために使用される試薬及び/又はキャリヤーと共に防腐剤 (图118からポンプにより空洞を遮って循環させ、そしてポンプの入口に戻す)。

好ましい態様においては、モノマー-キャリヤー溶液は、第一階液 (本明細書において階層「A」と称する) 及び第二階液 (本明細書において階層「B」と称する) を組合することにより形成する。表2に階層Aのために使用し得る混合物の例を示す。

表 2

代謝的モノマー-キャリヤー階層「A」

100wt	N V O Cアミノ保護アミノ酸
37wt	H O B T (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール)
250wt	D M F (ジメチルカルムアミド)
86wt	D I E A (ジソアロビルエチルアミン)

階層Bの組成を表3に示す。階層A及びBを混合し、そして空洞にて約8分間反応せしめ、次に2mlのM Fにより射出し、次に500μlをスライドの表面に適用するか、あるいは該液体を反応槽を通して循環させ、そして直温にて約2時間反応させる。次にスライドをD M F、塩化メチレン及びエタノールにより洗浄する。

表 3
代表的なモノマー-キャリヤー溶液「B」

250 ml	D M F
111mg	B O P (ベンゾトリアゾリルーカーボキシ トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウム ヘキサフルオロホスフエート)

結合されるペクソノマーを含有する溶液が空間を遮って保護する膜、該アミノ酸又は他のモノマーはそのカルボキシ末端において、脱保護されている基体の頭部上のアミノ基と反応するであろう。さうまでもなく、本発明を空間を通してのモノマーの回収を用いて説明するが、スライドを反応器から取り外しそしてそれを適切なモノマー溶液に浸漬することによって本発明を実施することもできる。

第一モノマーの付加の後、次にこの第一アミノ酸を含有する溶液を系から排除する。アミノ酸の除去が保証される程度十分な量（例えば、空間及びキャリヤー管路の容積の約50倍）のD M F／液化メタレンの混液の後、マスク又は基体を再配置しあるいは新たなマスクを使用して基体上の第二領域を光に曝露し、そして光1-24を第二の暴露のために用いる。これが基体上の第二領域を脱保護し、そしてこの方法を目的のポリマー配列が合成されるまで反復する。

次に、講義体化された基体全体を、詳しくは蛍光標識により保護された柱状の受容体に暴露する。これは、該受容体の特徴又は暴露法を空洞を通して確認させもが、又はスライドの表面をばらばらに接触せしめることによより行う。

のため、追加の液体（例えば、ヤギ-マウス-ヤギ）を用いてこの方法を反復することができる。

好みの組織においては、順序付けられた一連のマスクが使用される。幾つかの組織においては、所与のモノマーセットの可能なポリマーのすべてを合成するために1個という少い数のマスクを使用することが可能である。

例えば、4種類の鳥糞から16種類すべてのジスクレオチドを合成することが望まれる場合、1cm²平方の合成領域が各0.25 cm²幅の16個の列に概念的に分けられる。第一マスクは列の最左列を暴露し、ここではAが結合する。第二マスクは次の列を暴露し、ここではBが結合され、次にC列の列の第三マスクが使用され、そしてDのために最左列を暴露する最終マスクが用いられる。第一、第二、第三及び第四マスクは異なる場所に移動される單一マスクであることができる。

ダイマーの第ニユニットのためにこの方法は水平方向に反復される。この時、マスクはやはりり、2.5 cm²幅の水平平行の暴露を可能にする。反応領域の水平の4分の1を暴露するマスクを用いてA、B、C及びDが逐次結合される。得られる基体は4種類の16種のダイマーすべてを含有する。

ジペプチドを含有するために用いられる8個のマスクは移動、又は回転により相互に関連している。実際にはそれが適切に移動又は回転されれば1個のマスクを使用することができる。例えば、單一の透明領域を有するマスクを逐次使用して並列のそれぞれ各暴露し、90°移動させ、そして次に水平平行の暴露のために逐次使用することができる。

特許平4-505763 (14)

受容体は、結構的配列を含む基体のある領域に優先的に結合するであろう。

抗体は、例えばP B S (リン酸緩衝液) 中約1%のB S A (ウシ血清アルブミン) 及び0.5% Tweenの溶液であることができる「スーパー-カクテール」と一般に称されるものの中に典型的には販売される。抗体はスーパー-カクテール緩衝液中に例えば約0.1~4 mg/mlの最終濃度に希釈される。

図8Bは、図8Aに示す反射器の他の好みの形状を示す。この構造に従えば、マスク120が基体に直接接触して置かれる。詳しくは、光の分散の効果を最小化するように、マスクのエッティングした部分を下に向けて配置される。この構造に従えば、マスクは基体に近接して置かれるので像彩レンズ120及び126は必要でない。

この装置のシグナル対ノイズ比を高める目的で、本発明の幾つかの技術は、第一の標準されているか又は標準されていない受容体への基体の暴露、及びこれに続く、該第一受容体上の複数の部位に結合する標識された第二受容体（例えば抗体）への暴露を用いる。例えば、第一受容体が第一の種の動物に由来する抗体であれば、第二受容体は該第一の種と同種するエピトープに向けられた第二の種に由来する抗体である。例えばマウス抗体の場合、マウス抗体上の複数の部位に結合させるために抗-マウスである蛍光標識されたヤギ抗体又は抗血清を用いて、各結合部位への抗-マウス抗体の結合と比べて数倍の蛍光を帰ることができる。更なるシグナルの増幅

図9及び図10は、第一レベルにおいて9種類の異なるモノマー、第二レベルにおいて4種類の異なるモノマー、及びストップバターンの第三レベルにおける9種類の異なるモノマーを有する3モノマー（強基）のポリマー鎖の合成のための、それぞれマスクプログラム及びサンプルアウトプットの計画のためのQuick Basic Basicの詳細なコンピュータープログラムを提供する。プログラムのアウトプットは、セルの数、各マスク上の「エレメント」（光頭域）の数、及びマスクの各暴露のために必要な移動の量である。

符表平4-505763(15)

8-5

Machine Security Duties

Number of residues: 3	
Residue 1	3 building blocks
Residue 2	4 building blocks
Residue 3	3 building blocks
Number of cells: 63	
Mask for residue 1	
Number of strips: 1 Width of each strip: 10 Stripe 1 begins at location 1 and ends at 10	
For each of 3 building blocks, translates mask by 20 cell(s)	
Mask for residue 2	
Number of strips: 1 Width of each strip: 10 Stripe 1 begins at location 11 and ends at 20	
For each of 4 building blocks, translates mask by 20 cell(s)	
Mask for residue 3	
Number of strips: 1 Width of each strip: 10 Stripe 1 begins at location 21 and ends at 30	
Stripe 2 begins at location 22 and ends at 31	
Stripe 3 begins at location 23 and ends at 32	
For each of 3 building blocks, translates mask by 20 cell(s)	
Mask for residue 3	
Number of strips: 12 Width of each strip: 1	
Stripe 1 begins at location 1 and ends at 1	
Stripe 2 begins at location 6 and ends at 6	
Stripe 3 begins at location 11 and ends at 11	
Stripe 4 begins at location 16 and ends at 16	
Stripe 5 begins at location 21 and ends at 21	
Stripe 6 begins at location 26 and ends at 26	
Stripe 7 begins at location 31 and ends at 31	
Stripe 8 begins at location 36 and ends at 36	
Stripe 9 begins at location 41 and ends at 41	
Stripe 10 begins at location 46 and ends at 46	
Stripe 11 begins at location 51 and ends at 51	
Stripe 12 begins at location 56 and ends at 56	
For each of 3 building blocks, translates mask by 1 cell(s)	

• Copyright, 1990, Affymax R.W.

V. 基本検出装置の構造の詳細

図9は基体上の強光探査された受容体を検出するための蛍光検出装置を示す。基体112はx/y移動テーブル202の上に置かれる。好ましい態様においては、x/y移動テーブルはニューポート社(Newport Corporation)により製造されるモデルNo.PMS00-A1である。x/y移動テーブルは、例えば最初にプロダクションされたIBM PC/AT又はAT適合コンピューターであってもよい適切にプログラムされたデジタルコンピューター204に接続されそしてそれにより制御される。さうまでなく、ここで明示のために使用するATコンピューターに代えて他のコンピューター系、確定的目的のハードウェア等を容易に用いることもできる。本明細書に記載する移動及びデータ収集機能のためのコンピューターソフトウェアは、例元はナショナル・インストルメンツ(National Instruments)によりライセンスされる「Lab Windows」(すべての目的のため引用により本明細書に組み入れる)を含めて、市販のホフトウェアに書いて提供され得る。

基体及びx/y移動テーブルは、1又は複数の対物レンズ208を含む原鏡鏡206のものとに置かれる。幾つかの座標においてはスペクトロフィジック(Spectrophotometer)により製造されるモデルNo.2020-09アルゴンイオンレーザーであるレーザー210からの光(約488nm)が、約520nmより長い波長の光を遮りしきし488nmの光を反射するダイクロイックミラー(dichroic mirror)

207により基体に向けられる。ダイクロイックミラー207は例えばカール・ザイス(Carl Zeiss)により製造されるモデルNo.FT510である。次にこのミラーから反射された光は頭微鏡206に入り、この頭微鏡は例えばカール・ザイスにより製造されるモデルNo.Axiocam P20であることができる。基体上のフルオレッセイングマスクされた物質は約488nmの光で蛍光を発し、そしてこの蛍光は頭微鏡により捉められ、そして鏡を通過するであろう。次に、基体からの蛍光は拡張フィルター209を通りそして次に閉口部211を透過するように向けられる。拡張フィルター209は例えばメリエ・クリオット(Merle Crisell)により製造されるモデルNo.OO530であることができ、そして閉口部211は例えばカール・ザイスにより製造されるモデルNo.477352/477380であることがある。

次に蛍光は、幾つかの座標においてはハマツにより製造されるモデルNo.R943-02である光増倍管212に入り、シグナルは増幅器214において增幅され、そして光子が光子カウンター216によりカウントされる。光子の数はコンピューター204において場所の閾値として記録される。例えば、前増幅器(214)はスタンダード・リサーチ・システムズにより製造されるモデルNo.SR440であることができ、そして光子カウンターはスタンダード・リサーチ・システムズにより製造されるモデルNo.SR400であることがわかる。次に、基体を次の場所に移し、そして工程を反復す

特許平4-505763 (16)

る。好ましい結果においては、データーは1~100μmごとに得られ、約0.5~10μmのデーター収集直角が好ましい。十分に高い蛍光を示す試験において、広視野顕微鏡を用いるCCD検出器が用いられる。

レーザーに応答して所与の領域から生ずる電子の波をカウントすることにより、蛍光標識された分子が位置する基板上の場所を決定することができる。次に、例えばその表面上に合成されたポリペプチドのマトリクスを有するスライドについて、ポリペプチドのどれが蛍光標識された受容体に対して相対的であるかを決定することができる。

好ましい結果に於れば、基板に当たられる光の強度及び時間は、蛍光放射を最大にしそしてバックグラウンドノイズを最小にすることによるシグナル対ノイズ比の改善のために、レーザー出力及びスキャンステップ速度を変えることにより調整される。

接着装置等、本明細書においては主として、標識された受容体の検出に関して説明したが、本発明は他の分野でも用途を有するであろう。例えば、本明細書において開示される検出装置は触媒、DNA又は蛋白質のゲルスキャニング等の分野において使用することができるであろう。

VI. 受容体の相対結合強度の決定

本発明のシグナル対ノイズ比は十分に高く、リガンドに対する受容体の存在又は不存が検出され得るのみならず、種々の配列に対する受容体の相対的結合親和性を決定することができる。

120μlの水及び120μlの水酸化ナトリウムを含む95%エタノール1mlから取るアルカリ浴にスライドを12時間浸漬する。次にスライドを純水で洗浄しそして空気乾燥し、そして95%エタノールの溶液で一度すすぐ。

次に、ガラス表面又はリンカー分子にアミノ基を付加する目的で、スライドを例えばアミノプロピルトリエトキシンランによりアミノ化する。しかし、この目的のためにオメガーオキシ化シランを用いることができる。1つの試験においては0.1%のアミノプロピルトリエトキシンランが用いられるが、10⁻¹%~10%濃度の溶媒を使用することができ、約10⁻¹%~2%が好ましい。0.1%混合物は、100μlの95%エタノール/5%水混合物に100マイクロリッター(μl)のアミノプロピルトリエトキシンランを加えることにより調製される。この混合物をおよそ周囲温度にてロータリーシューカー上で約5分間攪拌する。次に、500μlのこの混合物を各被検されたスライドの一方の側の表面に適用する。スライドをこの溶液からダカントし、そして例えば100%エタノールに洗すことにより3回すすぐ。

ブレードが乾燥した後、これらを110℃~120℃の真空オーブンに約20分間入れ、そして次に空温にて約12時間アルゴン雰囲気中で活性化させる。次に、スライドをDMP(ジメチルホルムアミド)浴液に浸し、次に塩化メチレンにより十分に洗浄する。

次に、各アミノ基にNVO-C-GABAを結合させるため、スライドのアミノ化された表面を、例えばDMP中NVO-C

アルミニウム基は並列している数つかのペアテド配列に結合するが、幾つかの配列には他の配列に対するよりも強く結合することが見出される。多くの受容体分子が強く結合したリガンドの領域内で結合するであろうから、強い結合親和性は低い蛍光又はラジオグラフィーシグナルにより証明されるであろう。前に、受容体に対する弱い結合親和性を有するリガンドを有する基板の特徴の領域においては比較的小数の受容体分子が結合するため、弱い結合親和性は弱い蛍光又はラジオグラフィーシグナルによって証明されるであろう。また、リガンドの相対結合アビティ(セレクティビティ)(又は、1価相互作用の場合には親和性)を、複数のリガンドを含有する複数の蛍光又はラジオグラフィーシグナルの強度によって決定することが可能になる。

親和性についての半定量的データーもまた洗净条件及び受容体の濃度を読むことにより得られるであろう。これは、例えば、既知のリガンド受容体対と比較することにより行われるであろう。

VII. 逆

次の例は本発明の有効性を説明するために提供される。すべての操作は、特にことわらない限りおよそ周囲温度及び圧力において行われた。

A. スライドの調製

反応性基の結合の場合に、好ましい結果においては試験用スライド又はカバースリットのごときがラス板基板である基板を用意するのが好ましい。1つの試験に於れば、例えば

-GABA(γ-アミノ酸) NHS(N-ヒドロキシサクシニキド)の3cm格子約500μlに暴露する。

表面を、例えばDMS、塩化メチレン及びエタノールで洗浄する。

成形上のすべての未反応アミノプロピルシラン…すなわちNVO-C-GABAが結合しなかったアミノ基…を、純水赤銅とゼリシンとの1:3混合物に1時間曝露することによりアセチル基によりキャップする(異なる反応を防止するため)。この表面キャッピング処理を行うことができる他の物質には硝水トリフルオロ酢酸、硝酸酢酸無水物、又は他の反応性アシル化剤が含まれる。最後に、スライドをDMS、塩化メチレン及びエタノールにより再度洗浄する。

B. 「A」及び「B」の8種のトリマーの合成

図1は、2-モノマーセット:G1_n及びP1_m(それぞれ、「A」及び「B」により示す)の8種のトリマーの可能な組合せを示す。8-ユニクロベラトリルオキシカルボキシミド(NVO-C-NH)強度で終るシラン基を抱持するガラススライドを基板として調製する。アミノ基においてNVO-Cにより保護されたS1_n及びP1_mの活性エヌカルボキシルオキシカルボキシル、DMS等を試験として調製する。この例には問題ないが、モノマーセットのために保護基が必要な場合、これらは直接を構造するために使用される先の段階において光反応性であってはならない。

サイズnのモノマーセットについて、長さnのすべての可能な配列を合成するためにはカムとサイクルが必要である。

1つのサイクルは次のことから成る：

1. 次の現象が付加されるべき部位でのアミノ基の露出のための適切なマスクを通過しての照射、及び保護の副生状態を除去するための適切な洗浄。

2. 陰陽 1において特定された部位においてのみ反応するであろう单一の活性化されそして保護された（同じ光化学的に除安可能な基による）モノマーの添加、及び過剰の試薬を表面から除去するために適切な洗浄。

1つの操作においては、上記のサイクルは基体上の各場所が1つの強度により曝露されるまでモノマーセットの各構成員について反応される。他の操作においては、次の場所への移行の前に幾つかの段階が1つの場所において次々と持加される。サイクル時間は一括にカップリング反応速度により制限され、今や自動化されたペーテッド合成においては20分間と短い。場合によってはこの段階の後に、複数の試薬のために並列を安定化するために保護基の付加を行う。ポリマーの幾つかのタイプ（例えばポリマー）のため、全表面の最終的脱保護（元保護側鎖基の除去）が必要かも知れない。

さらに詳しくは、図10Aに示すように、カラス20は暗域22、24、26、28、30、32、34及び36を積める。図10Bに示すように暗域30、32、34及び36をマスクし、そしてガラスを照射し、そして「A」（例えば817）を含有する試薬に曝露し、図10Cに示す構造を得る。次に暗域22、24、26及び28をマスクし、ガラスを照射し（図10Dに示すように）、そして「B」（例えば817）を含有する試薬に曝露し、図10Eに示す構造を得る。

必要とされるリングラフィー段階の最大数は一層に、モノマーの各「層」についてであろう。すなわち、必要とされるマスクの総数（そして、それ故にリングラフィー段階の数）は $\alpha \times s$ であろう。透過性マスク領域のサイズは合成のために利用される基体の面積及び形成されるべき配列の量に依存するであろう。一層に、合成領域のサイズは：

合成領域のサイズ = (A/S)

であり、ここで

Aは合成のために利用可能な全面積であり、そしてSはこの全面積において望まれる配列の数である。

本明細書に開示されるメトリリングラフィー技術を用いて、1つの基体上で数千乃至数百万のオリゴマーを同時に製造するためには前記の方法を容易に用い得ることを、当業者は理解するであろう。従って、この方法は、多段の例えびー、トリー、テトナー、ベンダー、ヘキサー、ヘプターもしくはオクタペテド、又はより大きなペチド（又は、対応してポリヌクレオチド）を得て試験するための可塑性をもたらすであろう。

上記の方法は平均の例により本法を説明している。さうでもなく、自動化法又は半自動化法を用いることもできる。試薬の自動添加及び除安によって、必要とする試薬の容量を最小にしそして反応条件をより注意深く調節するために、基体を溶液セル中に配置することができる。我々に用いるマスクは手動的又は自動的に適用することができる。

特表平4-505763 (17)

p 54) を含有する試薬に曝露して図10Eに示す構造を得る。図10Eに示される構造が得られるまで、示されるようにセクションを次々にマスク及び曝露して工程を進行せしめ、ガラスを照射し、そして場合によってはアセチル化により未結合基をキャップする。示されるように、エチル/プロピルのすべての可能なトリマーが得られる。

この例においては固形保護基の除安は必要でない。戻すにより、エタノンチオール及びトリフルオロ酢酸による処理によって粗粗の脱保護を行なうことができる。

一般に特定のポリマー鎖を得るために必要な段階の数は、

$$\alpha \times s \quad (1)$$

により定義され、ここで

α = モノマーのベースセット中のモノマーの数、及び
 s = ポリマー鎖中のモノマーユニットの数、

である。

他方、長さsの配列の合成される数は、

$$\alpha^s \quad (2)$$

である。

さうまでもなく、やはりより短い長さを有するポリマーの合成を含むであろうマスク法を用いることにより、一度大きな多倍数が得られる。極端な例において、より短いか又はそれと同じ長さを有するすべてのポリマーが合成されれば、合成されるポリマーの数は：

$$\alpha^s + \alpha^{s-1} + \dots + \alpha^1 \quad (3)$$

であろう。

C. アミノプロピル基及び螢光基のダイマーの合成

アミノプロピル基及び螢光基のダイマーの合体において、基体として官能化されたドラボア（diisopropylamine）鎖を用いた。ドラボア（diisopropylamine）鎖はアミノプロピル基を有するポリビニリデンジフルオロリドである。アミノプロピル基を、カルボニルクロリドとアミノ酸との反応によりDD2基によって保護した。この反応は自発的によく知られた反応である。これらの基を担持する表面をEBGの種被に入れ、そして1回の不透明領域及び透明領域のチャッカーボートパターンを有するマスクに接触させた。マスクを約280nm以上の波長を有する紫外線に5分間、室温にて暴露した。但し、本発明の基々の意図において、広範囲の暴露時間及び温度を使用するのが適当である。例えば、1つの層においては、-70℃～+50℃の工程温度において約1～5000秒の暴露時間を用いることができる。

1つの好ましい施設において、およそ表面圧力における約1～500秒間の暴露時間が使用される。幾つかの好ましい施設においては、蒸気を防止するために両面圧より高い圧が用いられる。

次に、膜の表面を約1時間、ランタエドの中レートに結合した活性エステルを含む螢光顔料により暴露した。暴露時間は数分間～数時間の広い範囲で異なるであろう。これらの物質は及び線可視領域で螢光を発する。フルオロボア（[1-(4-オクトヨウカニル)エチル]中性活性エステルとの反応が完了した後、フルオロボアが結合した顔料を、それらを紫外線に暴露し

そして、赤及び緑の蛍光を減衰することにより、可視化することができる。基体の誘導体化された領域はマスクのものとパターンに密接に対応することが観察された。

D. シグナル可視化的近似

シグナル検出の可能性が、フロー・サイトメトリー・スタンダード（Flow Cytometry Standard）により定義されたモデル版 8.2.4 の低レベル標準蛍光ビーズキットを用いて説明された。このキットは、既知の数の蛍光分子が合流された直径 5.8 μm のビーズを含む。

ビーズの 1 つも、最初シャッターが閉められたレーザーのフィールド中の図 9 に示すスキャンステージ上の証明フィールド中に置いた。証明フィールド中に置いた後、光子検出装置を作動させた。レーザービームはブロックされず、そして粒子ビームと相互作用し、これは次に並光を発した。7.000 及び 28.000 のフルオレッセイン分子で合流されたビーズの蛍光曲線をそれぞれ図 11A 及び図 11B に示す。各曲線上に、フルオレッセイン分子を伴わないビーズについての追跡輪も示してある。これらの実験は 4.8 mm の距離、1.00 mm のレーザー出力を用いて行われた。光は 40 バラ -0.75 NA 増物レンズを通して焦点を結ばせた。

蛍光強度はすべての場合に高い種から始まり、そして次に指数的に減少した。強度の低下はフルオレッセイン分子の光吸収（photobleaching）によるものである。フルオレッセイン分子を伴わないビーズの追跡輪はバックグラウンドの吸引のために用いられる。複数されたビーズ及び

底を有するスライドは、アミノプロピルトリエトキシシランの濃度が 1.0% ~ 1.0~% の間で異なる間に、再現性よく作ることが各自決定された。

F. NYOC の除去及び蛍光標識の付加

NYOC-GABA を前記のようにして付加した。1 個のスライドの全表面を光に曝露して Y-アミノ酸の末端の遊離アミノ基を露出した。次に、このスライド及び曝露されていない同じものをフルオレッセインイソチオシアヌート（FITC）に曝露した。

図 12A は先に曝露されなかつたがしかし FITC に曝露されたスライドを示す。X 軸の単位は時間であり、Y 軸の単位はカウントである。追跡輪はある量のバックグラウンド蛍光を含むする。もう一方のスライドを 3.50 mm のバンド幅間に約 1 分間曝露し（12 mW/cm²、~3.50 mm 照明）、洗浄し、そして FITC と反応させた。このスライドの蛍光曲線を図 12B に示す。強度レベルの大きな増加が観察され、これは、光分層がスライドの表面上の多數のアミノ基を蛍光マーカーの付加のために露出したことによっている。

G. NYOC の除去におけるマスクの使用

次の実験を 0.1% アミノプロピル化スライドを用いて行った。Hg-Xe ハーク灯からの光を、レーザー切除了ガラス上クロムマスクを通して、基体を直接接触させることにより基体上に像形成した。

このスライドを 1.00 mm の 3.50 mm バンド光により約 5 分間照らし、そして次に 1.00 mm の FITC 時段と反応させた。これ

特表平 4-505763 (18)

赤緑珠ビーズの間の最初の指数的低下の差を積分して光子カウントの全数を得、そしてこの数はビーズ当たりの分子の数に関連する。結果て、抽出され得るフルオレッセイン分子当たり光子の数を推定することができる。図 11 に示す曲線について、この計算が示すところによれば、この計算はフルオレッセイン分子当たり約 4.0 ~ 5.0 個の光子の放射を示す。

E. 単位面積当たり分子の数の決定

前記の方法に従って調製されたアミノプロピル化ガラス顕微鏡スライドを用いて指スライドの複雑密度を建立した。スライドの追跡アミノ基を、ほアミノ酸と共有結合を形成する FITC（フルオレッセインイソチオシアヌート）と反応せしめた。次に、スライドをスキャンニングして、フルオレッセイン分子当たり光子の予想値を用いて、単位面積当たり表面上の分子の数の計算を可能にする領域中に発生するフルオレッセイン光子の数をカウントする。

その表面にアミノプロピルシランを有するスライドを日本 P 中 FITC の 1.0 M 濃度におよそ同温度にて 1 時間すりだ。反応の後、スライドを DMSO で 3 回、そして次にエタノール、水、そして次に再度エタノールにより洗浄した。次に、それを乾燥し、そしてそれが試験され得る状態になるまで貯蔵する。

図 11 に示すと同様な曲線を使用し、そして指数的減少シグナルのもとの蛍光カウントを積分することによって、誘導体化後の表面上の追跡アミノ基の数を決定した。1.0 × 1.0 × 約 2 × 2 mm 当り 1 フルオレッセインの複雑化密

をレーザー検出スキャンニングステージ上に置き、そして蛍光強度のネジションカラーコードの 3 元表示としてグラフをプロットした。繰り返しマスクを通して実験を多回反復した。1.00 × 1.00 mm マスク、2.0 mm マスク、2.0 mm マスク及び 1.0 mm マスクの蛍光パターンが示すところによれば、このリソグラフィー技術を用いてマスクパターンは少なくとも約 1.0 mm 以上で区別される。

H. YGGF 上の付加、並びこれに続く Hg-Xe 基体及びナトリウムマスクへの影響

特定のポリペプチド配列に対する受容体が表面結合ペプチドに結合し、そして検出されることを確立するために、レウエンケファリンを表面に結合させ、そして抗体により認識させた。スライドを 0.1% アミノプロピルトリエトキシシランにより防腐処理し、そして NYOC により保護した。直角印刷（back-side contact printing）を用いて流れセル中のスライドを暴露するため 3.00 mm チュックボードを用いた。レウエンケファリン配列（Hg-N-チロシン、グリシン、グリシン、フェニルアラニン、ロイシン-COOH、あるいは本明細書において YGGF と称する）をそのカルボキシ末端を介して、スライドの表面に露出されたアミノ基に結合させた。ペプチドを BO-P/HOBT/DIEA キャップリング試験と共に DMSO 濃度に加え、そして流れセルを通して 2 時間、室温にて再培養させた。

Hg-Xe 基体として知られる第一抗体をスライドの表面に

45分間、2回/回にて、スーパークテイル（この場合さらにに1%BSA及び1%オバルブミンを含有する）中で透析した。次に、第二抗体、すなわちヤギ抗体マウス・フルオレッセイン結合体を2mg/mlでスーパークテイル緩衝液中に加え、そして2時間インキュベートした。

この結果を、位相の観察としての蛍光強度としてプロットした。この像を10倍段階でとり、そして次のことが示された。よく発現されたパターンで脱保護が行われ得るのみならず、（1）この方法は基体の表面へのペプチドの転写基のカップリングをもたらし、（2）結合したペプチドの表面は抗体との結合のために利用可能であり、そして（3）検出装置の能力は受容体の結合を検出するのに十分であった。

I. YCCFLのモノマー並列合成及びそれに続く脱保護への過程

我々の正方形におけるYCCFL及びGCPFLのモノマー並列合成をスライド上チャッカーボードパターン中で行い、そして得られるスライドをHerr抗体に曝露した。この実験を図13A及び図13Bに示す。

図13Aにおいて、この場合はL-BOC（L-アブトキカルボニル）で保護されているアミノプロピル基により脱保護されたスライドを示す。スライドをTPAで處理してL-BOC保護基を除去した。次に、そのアミノ基ににおいてL-BOC保護されているE-アミノカプロン酸をアミノプロピル基に連結した。アミノカプロン酸はアミノプロピル基と合成されるべきペプチドとの間のスペーサーとして機能する。

基体との直接接觸（「近接プリント」）において使用された50ムスクについての蛍光のパターンはより明瞭なパターンを与える。そしてチャッカーボードパターンの内は、マスクが基体に直接接觸して置かれた結果として感動的であった（これは、この液体を用いての蛍光度の増加を反映している）。

J. YGGFL及びYPGCPFLのモノマー並列合成

図13に示したものに類似する50ムチャッカーボードマスクを用いての合成を行った。しかしながら、追加の連結段階を通して基体上のGCPFL部位にPを加えた。保護されたGCPFLをマスクを通して光に曝露し、そして次に、前記のようにしてPに曝露することによりPを付加した。従って、基体上の領域の半分はYGGFLを含むし、そして残りの半分はPGCPFLを含む。

この実験についての蛍光プロットが示すところによれば、領域はやはり、結合が起った領域と結合が起らなかった領域との間が容易に識別できる。この実験は、抗体が特定の配列を認識し得ること、及びこの認識が最も保存的でないことを示した。

K. YGGFL及びYPGCPFLのモノマー並列合成

本発明の最適可操作性をさらに示すため、前記のような技術を用いて基体上に交叉のYCCFL及びYPGCPFLの50ムチャッカーボードパターンを合成した。得られる蛍光プロットが示すところによれば、抗体はYGGFL配列を明確に認識することができてYPGCPFL領域には非常に結合しなかった。

特表平4-505763 (19)

スペーサーのアミノ末端を脱保護し、そしてNVO-C-OAI-Sに連結した。次に、スライド全体を12mMの32.5nmのバンド風呂により脱明した。次に、スライドをNVO-C-O-AI-NH₂と連結しそして洗浄した。スライド全体を再び脱明し、そして次にNVO-C-O-Gly-Sに連結しそして洗浄した。スライドを再び脱明し、そしてNVO-C-O-Gly-Sに連結して図13Aの最後の部分に示す配列を形成した。

次に、図13Bに示すように、スライドの交互の領域を500×500ムチャッカーボードマスクを用いる複数プリントを用いて脱明し、こうしてグリシンのアミノ基を脱保護された領域においてのみ露出させた。次の連結化学反応段階を行うときNVO-C-O-Gly-Sを加え、そしてそれを脱明を受けた所においてのみ連結させた。次に、スライド全体を脱明してすべてのNVO-C基を除去し、脱明された領域にYGGFL及びYGGFLを脱明し、そして他の領域にGCPFLを脱明した。Herr抗体（これはYGGFLを認識するがしかしLGGFLを認識しない）を加え、次にヤギ抗体マウス・フルオレッセイン結合体を加えた。

得られる蛍光スキャンは、Herr抗体により認識されない（そしてそれ故にヤギ抗体マウス抗体・フルオレッセイン結合体との結合が存在しない）チャラベグテドGCPFLを含む領域、及びYGGFLが存在する赤い領域を示した。YGGFLペプチドはHerr抗体により認識され、そしてそれ故に、脱明された領域にはフルオレッセイン結合抗体マウスが認識する抗体が存在する。

II. 二重のうち領域の異なるアミノ酸配列の合成及びHerr抗体への組合結合性の評価

前記の技術に類似する技術を用いて、一連の16種類の異なるアミノ酸配列（4通り反復）を2枚のガラス基体のそれぞれの上で合成した。スライドの全面面にわたって配列NVO-C-O-GFLを添加することにより配列を合成した。次に、一連のマスクを用いて2層のアミノ酸を基体に選択的に適用した。各領域は0.26cm×0.0625cmの寸法を有していた。第一のスライドはL-アミノ酸のみを含むアミノ酸配列をもつており、そして第二のスライドは選択されたD-アミノ酸のみを含んだ。図14A及び図14Bはそれぞれ第一スライド及び第二スライド上の種々の領域のマップを示す。図14A及び図14Bに示されるパターンは各スライド上に4通り複数させた。次にスライドをHerr抗体及びフルオレッセイン結合ヤギ抗体マウスに曝露した。

L-アミノ酸のみを含む第一スライドの蛍光プロットは赤い領域（強い場合、すなわち149,000カウント以上）、及び黒い領域（Herr抗体がほとんど又は全く結合しない、すなわち0,000カウント以下）を示した。配列YCCFLは明らかに最も強く認識された。配列YAGFL及びYSGFLもまた抗体の強い認識を示した。これに対して、残りの配列のはほとんどが、ほとんど又は全く結合を示さなかった。スライドの4通りの反復部分はそこに示される結合の量において非常に一致していた。

L-アミノ酸スライドの蛍光プロットが示すところによれ

は、Y_{GGFL}配列により最も強い結合が示された。Y_{AGFL}、Y_{SGFL}及びY_{PGFL}に対して最も弱い結合が検出された。残りの配列は抗体との低い結合を示した。配列Y_{GCFL}の低い結合効率が観察された。

表6は試験された種々の配列を相対強度の順に挙げている。これは相対結合親和性に関する情報を提供する。

表 6
H_{ααα} A_{βββ}への見かけ上の結合

レーアミノ酸セット	リーアミノ酸セット
Y _{GGFL}	Y _{GGFL}
Y _{AGFL}	Y _{AGFL}
Y _{SGFL}	Y _{SGFL}
Y _{CGFL}	Y _{PGFL}
F _{GGFL}	F _{GGFL}
Y _{PGFL}	Y _{GGFL}
L _{AGFL}	F _{AGFL}
F _{AGFL}	W _{GGFL}
W _{GGFL}	F _{AGFL}
	W _{AGFL}

IV. 表面結合の例

本発明の他の特徴に従えば、この方法は、表面への固まれた（caged）結合員の結合を提供し、この結合員はその固まれた承認において、他の溶血的に結合する種、例えば受

者（caged）者が不安定化し、これにより活性化された結合員を放出する。典型的なエネルギー源は光である。

表面の結合員が一旦活性化された後、これらは受容体に付加され得る。選択される受容体はモノクローナル抗体、核酸配列、抗体受容体等であることができる。受容体常にではないが通常、それを直接的又は間接的に結合員に付加する事が可能のように説明することができる。例えば、結合員に対する強い結合親和性及び受容体又は受容体の結合体（conjugate）に対する強い親和性を有する典型的な結合物質を用いて、所望により結合員と受容体との間の結合として操作せることができる。この方法は、受容体が特定のリガンドに対するその活性を維持するように調整された受容体を用いる。

好ましくは、固体支持体に付加された固まれた結合員は活性化可逆性ビオチン複合体、すなわち、アビジン又はアビジン類似体に対して灭然ビオチンに比べて有する結合親和性を有するように活性化可逆性保険基により化学修飾されているビオチン分子であろう。好ましい操作においては、表面の所定の領域に配置された保険基が適当な放射源の適用の際に除抜されて結合員をもたらし、この結合員はビオチン、又はアビジンもしくはアビジン類似体に対してビオチンと実質的に同じ結合親和性を有する構造的に類似する化合物である。

他の好ましい操作においては、アビジン又はアビジン類似体が表面上の活性化された結合員と共に、複数アビジンが接着

特表平4-505763 (20)
容体及び特異的結合容質に対する比較的低い親和性を有する。この様な技術は、1989年9月8日出願の公報中の出願番号404,920にさらに十分に記載されており、これをすべての目的のため引用により本明細書に組み入れる。

この特徴に従えば、本発明は固体支持体の表面上の所定の領域を形成する方法を提供し、ここで、所定の領域は受容体を固定化することができる。この方法は、表面に結合された固まれた結合員を使用し、所定の領域の選択的活性化を可能にする。固まれた結合員は、所望の領域の選択的活性化の際に過剰されて最終的に受容体と結合することができる結合員として機能する。次に、活性化された結合員を用いて受容体のごとき特定の分子を基質に固定化する。上記の方法を基質上の同一の又は異なる部位において反復し、例えば同一の又は異なる受容体を含有する表面上の複数の領域を有する表面を得る。こうして固定化された受容体が又は複数のリガンドについて異なる親和性を有する場合、そのリガンドについてのスクリーニング及び測定を前記受容体を含むする表面の領域において行うことができる。

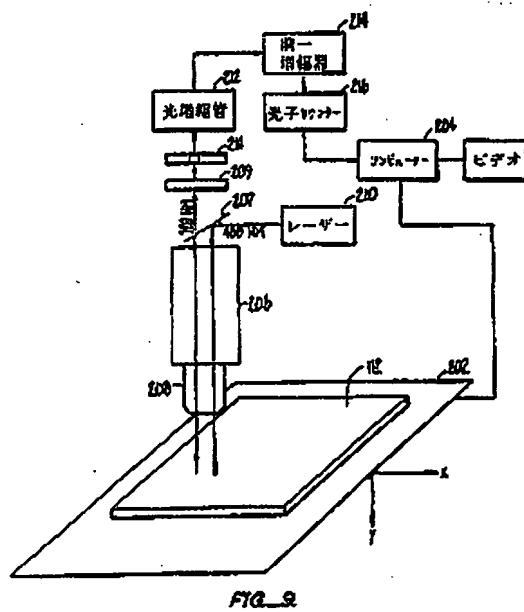
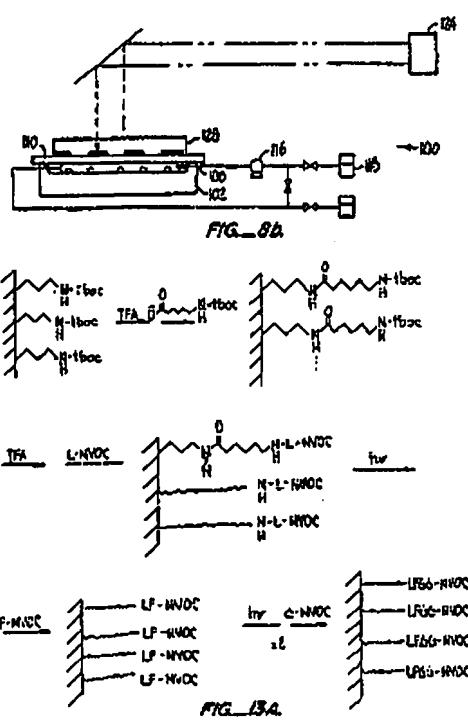
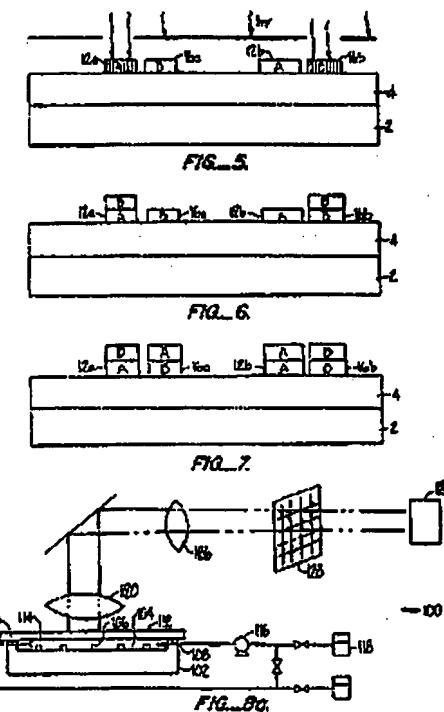
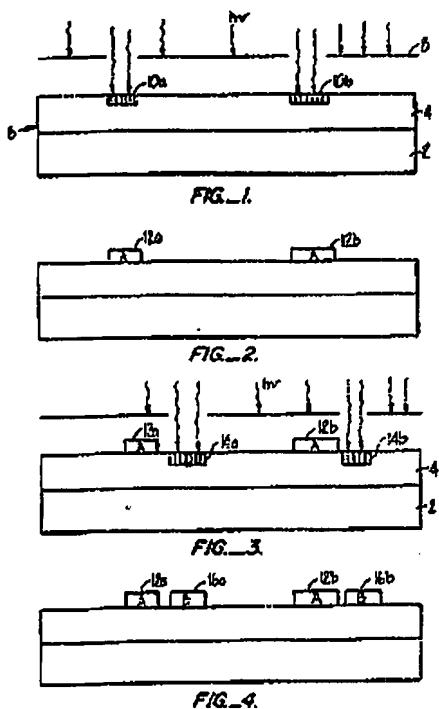
他の特徴も基質に付加された固まれた結合員を用いることができる。固まれた（不活性化された）結合員は、活性化された結合員の対応する親和性と比較した場合、固まれていない結合員に特異的に結合する物質の受容体に対する比較的低い親和性を有する。従って、活性化されるべき表面の領域に適当なエネルギー源が適用されるまで、結合員は反応から保護される。適当なエネルギー源の適用の際、囲んでい

る結合員がなく結合するまでインキュベートする。次に、表面の所定の領域上に固定化されたアビジンを扁型の受容体又は所望の受容体の結合体と共にインキュベートすることができる。アビジンが表面の所定の領域上に固定化される場合、受容体は好ましくはビオチン化され、例えばビオチン化抗体であろう。あるいは、好ましい操作は、あらかじめ調整されたアビジン／ビオチン化受容体複合体は、表面の活性化された結合員に与える。

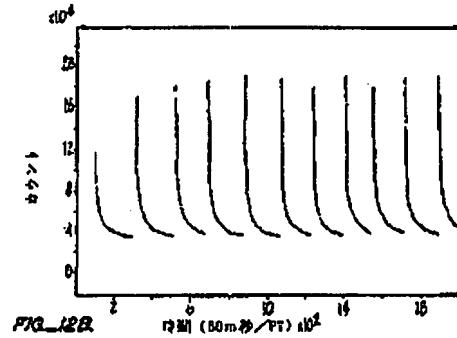
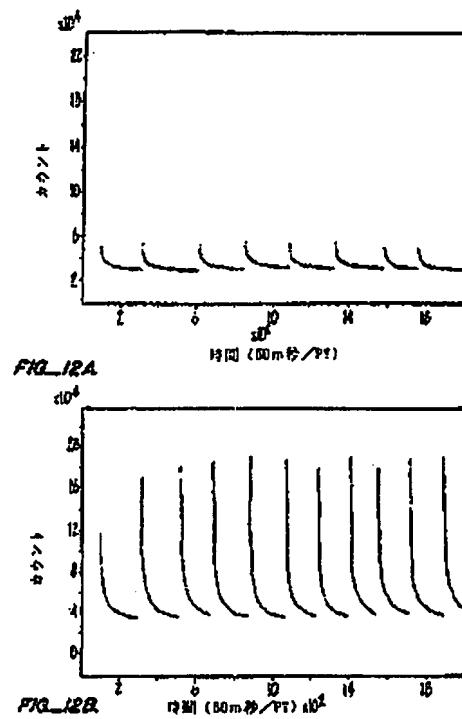
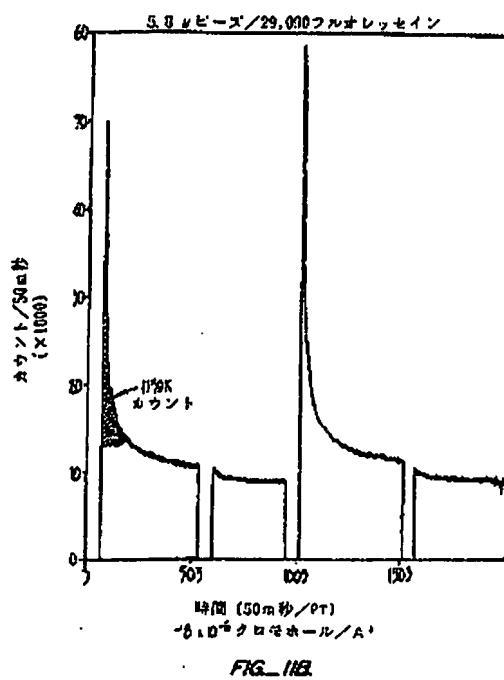
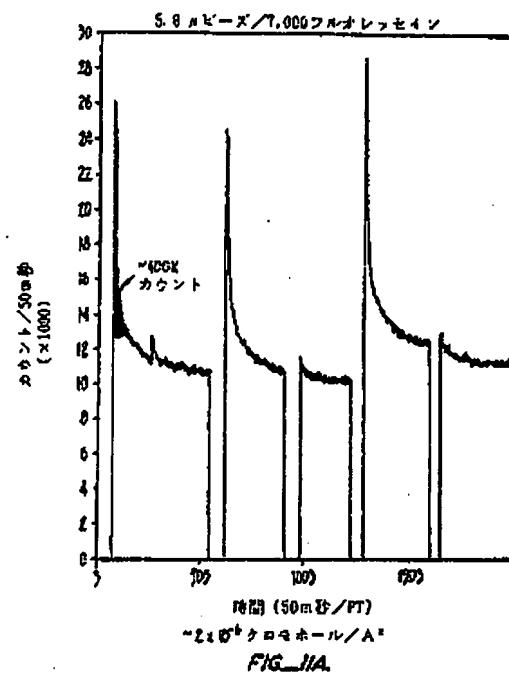
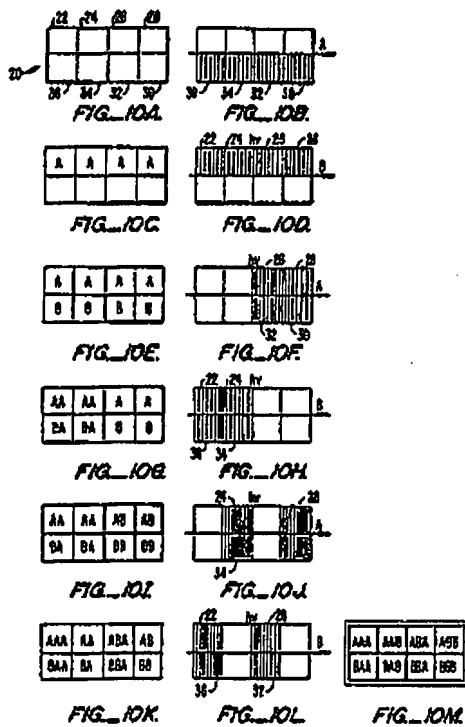
V. 結 論

本発明は、基質上でポリマーを合成するための非常に改良された方法及び装置に関する。前記の記載は断片的なものであって制限的なものではないことが意図される。前記の記載を踏襲した後、当業者には多くの類似が自明であろう。またして、本発明は主として元老院可燃性保険基の使用に着目して記載されているが、光以外の他の放射線を使用し得ることが当業者に容易に認識されるであろう。例えば、他の種類の照射において、電子ビーム照射、X-線照射（電子ビームリソングラフとの組合せにおける）、又はX-線リソグラフィー技術に対して選択的である保険基を用いるのが好ましいであろう。あるいは、液体への暴れにより基を除去することができよう。従って本発明の範囲は、前記の記載によって決定されるべきではなく、添付された請求の範囲及び該請求の範囲に均等な範囲にに関して決定されるべきである。

特典号4-505763(21)



特許平4-505763 (22)



特表平4-505763 (23)

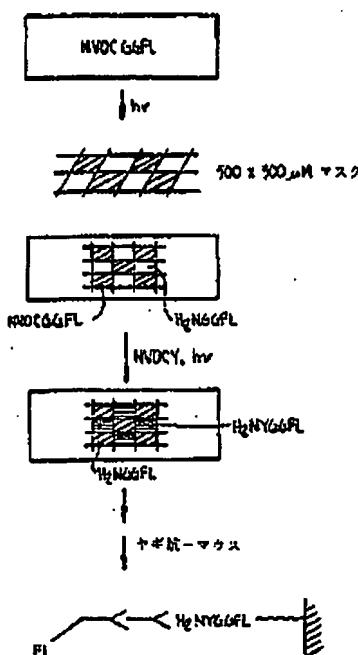


FIG. 13A

P	A	S	G	L
HPL	LAGFL	LSGFL	LGFL	L
EPL	FAGFL	EGFL	EGFL	F
WGL	WGFL	WGFL	WGFL	W
YFL	YAGFL	YGFL	YGFL	Y

FIG. 14A

P	O	S	G	Y
YFL	YOFL	YGF	YGF	Y
FPL	FOFL	FGF	FGF	F
WFL	WF	WGFL	WGFL	W
YFL	YAFL	YGFL	YGFL	Y

FIG. 14B

特許事の査定文登出書
(特典生第104号の8)

3-4 異補正

1. 第一の基体表面に上の知られた場所で種々の化学記号を置きする方法であつて、

(a) 基体の選択された領域にアクリル樹脂することにより保護膜を形成する:

(b) 選択可能な保護膜を有するモノマーに前記領域を露する:

(c) 選択 (a) 及び (b) を反復し、ここで前記選択された領域が同一の又は異なる領域であり、そして前記モノマーが同一の又は異なるモノマーであつて前記基体上で種々の記号を形成する:

ことを含んで成る方法。

特許出願の概要

平成9年12月1日

特許庁基官 面 反 互 用

2 特許出願の表示

PCT/NL90/00081

3 先願の名称

新富に大成模な固定化ペプチド合成

4 特許出願人

住所 オランダ恒アンティル、キュラソー、
ダリュイデルカデ 82

名称 アフィマックス テクノロジーズ
ナームロザ ベノートスハップ

5 代理人

住所 東京都渋谷区渋ノ内一丁目8番10号新光丸ノ内ビル
〒105-0004 (3504)0721

姓名 斎藤士 (6570) 黄木 順

(外子名)

6 権利登の提出年月日

1991年7月24日

7 権利登の自作

特許登の請求文

1通

特號平4-505763(24)

PERIODIC ASSESSMENT

Section	Case number, name of the defendant, and names of the inventors involved	Reference Number
A	IBM Technical Disclosure Bulletin, volume 6, no. 12, April 1964, ref. text: "Graphical additive printed circuit", page 1473, see the whole article	1
A	Chemical Abstracts, volume 80, no. 22, 5 December 1968, Columbus, Ohio, USA, M. Gurdas et al., "Electrostatic grafting techniques using radiation-induced grafting of acrylic acid onto poly (methyl methacrylate) fibers", see page 585, abstract 23221r & 10135, Eng. Sci. 1969, 20(16), 1265-73 (Eng.).	2
A	J. Vac. Sci. Technol., volume B1, no. 4, October-December 1983, American Vacuum Society, M. Morris et al., "Direct pattern definition on silicon resin by vapor phase electron beam polymerization", page 1171, see the whole article	3
D, X	EP, A, 0333256 (COMPEX-CORNING) 14 August 1989 see the whole text, especially example 12	16-48

四庫全書

烏鵲的憂愁

HL 9000039
SA 1781

This year's 6th place career hitting average is 300, which is a career best for the Florida Marlins. Credit is given to the team's offense, which has been efficient and timely throughout the season.

Open Requests and/or search results	Pending item	Vendor Entity monitored	P.D. Action item
CP-A- G32826	16-08-09	JPA-A- 032780	16-08-09

卷之四-505763 (25)

第1頁の続き

④Int. Cl. ³	類別記号	序内整理番号
G 01 N	33/53	U 8810-2J
	33/538	8810-2J
	38/541	8810-2J
# C 07 K	7/08	Z 8818-4H
C 07 K	89/00	

優先権主張 ⑦発明者	⑧1990年3月7日米国(US)⑨492,462 リード, ジエイ. レイトン	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94301, パロ アルト, ラモナ 1001
⑦発明者	フォドア, スティーブン ピー. ニー.	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94303, パロ アルト, ウィン ターグリーン ウエイ 817
⑦発明者	ストライア, ルパート	アメリカ合衆国, カリフォルニア 94305, スタンフォード, ソノ マ テラス 843